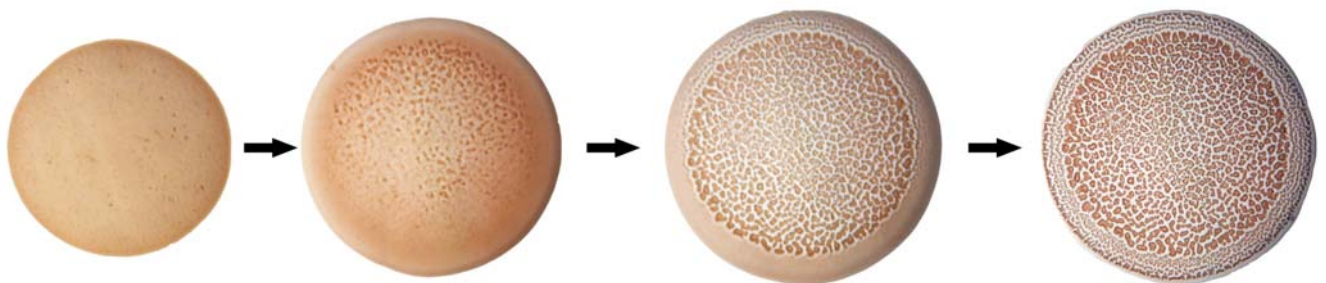


Sabrina Désirée Doß

**Analyse der morphologischen und physiologischen
Differenzierung
in *Sorangium cellulosum* So ce56**

Lon-Proteasen und Stickstoffmetabolismus

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
beim Fachbereich Biologie u. Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen



JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT
INSTITUT FÜR MIKRO- UND MOLEKULARBIOLOGIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

**Analyse der morphologischen und physiologischen
Differenzierung in *Sorangium cellulosum* So ce56**

Lon-Proteasen und Stickstoffmetabolismus

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Sabrina Désirée Doß
aus Pohlheim

April 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereiches Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. P. R. Schreiner

1. Gutachter Prof. Dr. G. Klug
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter Prof. Dr. A. Pingoud
Institut für Biochemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht am: 11. April 2007
mündliche Prüfung (Disputation) am: 25. Mai 2007

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myxobakterien	1
1.1.1	<i>Sorangium cellulosum</i>	2
1.2	Physiologische und morphologische Differenzierung	3
1.2.1	Physiologische Differenzierung	3
1.2.2	Morphologische Differenzierung	5
1.3	Proteasen	7
1.3.1	Lon-Proteasen	7
1.4	Stickstoffregulation in Myxobakterien	11
1.4.1	Stickstoffmetabolismus	12
1.4.2	P _{II} -Proteine	13
1.5	Zielstellung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Plasmide und Organismen	15
2.2	Zellanzucht	19
2.2.1	Nährmedien	19
2.2.1.1	LB-Medium	19
2.2.1.2	Minimalmedium	19
2.2.1.3	M-Medium	20
2.2.1.4	M-Diff-Medium	20
2.2.1.5	P-Medium	20
2.2.1.6	P-Diff-Medium	20
2.2.1.7	S-Medium	21
2.2.1.8	MYC-Medium	21
2.2.1.9	Produktionsmedium	21
2.2.1.10	Medienzusätze	21
2.2.2	Stammhaltung und Reinheitskontrolle	22
2.2.3	Anzuchtbedingungen	22
2.2.3.1	Statische Kultur	22
2.2.3.2	Plattenkulturen	23
2.2.3.3	Messung der optischen Dichte	23
2.2.3.4	Messung des Klettwertes	23
2.2.3.5	Zellzahlbestimmung	23

2.2.3.6	Erstellung einer Wachstumskurve von <i>S. cellulorum</i> - Bakterienkulturen	24
2.2.3.7	Bestimmung der Verdopplungszeit t_d einer <i>S. cellulorum</i> - Bakterienkultur	24
2.2.4	Methoden zur Charakterisierung des Phänotyps	24
2.2.4.1	Differenzierungsassay von <i>S. cellulorum</i>	24
2.2.4.2	Qualitativer Nachweis der Produktion von Sekundärmetaboliten mittels Bioassay	25
2.3	Transformation	25
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	26
2.3.1.1	Herstellung von elektro-kompetenten <i>E. coli</i> - Zellen	26
2.3.1.2	Elektroporation von elektro-kompetenten <i>E. coli</i> - Zellen	26
2.3.1.3	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> - Zellen zur Hitzeschock-Transformation	27
2.3.1.4	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> - Zellen	27
2.3.2	Konjugation von Plasmiden nach <i>S. cellulorum</i>	28
2.3.2.1	Der Konjugationsvektor pSUPHyg	28
2.4	Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	29
2.4.1	Behandlung von Geräten und Lösungen	29
2.4.2	Plasmid-Isolierung	29
2.4.2.1	Plasmid-Minipräparation	30
2.4.2.2	Plasmid-Minipräparation nach Peqlab	31
2.4.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cellulorum</i>	31
2.4.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. cellulorum</i>	32
2.4.5	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	33
2.4.5.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	33
2.4.5.2	Ethanolpräzipitation	33
2.4.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.4.7	Agarosegel-Elektrophorese	34
2.4.7.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.5	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren	35
2.5.1	Restriktion von DNA	35
2.5.2	Dephosphorylierung von DNA	36
2.5.3	Herstellung von <i>blunt-end</i> - Fragmenten	36
2.5.4	Ligation von DNA	37
2.5.5	Ligation von PCR-Fragmenten via TOPO® PCR Cloning	38
2.5.6	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch <i>nick translation</i>	38
2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
2.6.1	Oligonukleotide	41
2.6.2	PCR-Schnelltest zur Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> - Klone	45
2.6.3	PCR-Schnelltest zur Charakterisierung von <i>S. cellulorum</i> -Mutanten	45

2.6.4	Real-time RT-PCR	45
2.7	Überexpression von Fremdproteinen in <i>E. coli</i>	47
2.7.1	Aufreinigung rekombinanter Proteine	47
2.8	Proteinanalysen	47
2.8.1	Herstellung von Proteinextrakten	47
2.8.1.1	Zellaufschluss im RiboLyser	47
2.8.1.2	Zellaufschluss mittels Ultraschall	48
2.8.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford	48
2.8.3	Dialyse von Proteinlösungen	49
2.8.4	Fällung von Proteinen durch Aceton	50
2.8.5	Proteinfractionierung durch Ultrazentrifugation	50
2.8.6	Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	50
2.8.7	Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen	52
2.8.8	Färbemethoden für Polyacrylamidgele	53
2.8.8.1	Coomassie-Färbung	53
2.8.8.2	Silberfärbung	54
2.8.9	Demodifikationsassay	54
2.9	Immunologische Methoden	55
2.9.1	<i>Western Blot</i> - Analyse von Proteinen (<i>Western Blot</i>)	55
2.9.1.1	Detektion des Antikörper-Enzym-Konjugats	58
2.10	Enzymaktivitätstests	59
2.10.1	Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Glutaminsynthetase	59
2.11	Säulenchromatographische Methoden	60
2.11.1	Affinitätschromatographie	60
2.11.1.1	Heparinsäule	60
2.12	Geräte, Chemikalien und Enzyme	62
2.12.1	Spezielle Artikel und Geräte	62
2.12.2	Chemikalien	63
2.13	Molekularbiologische <i>Kits</i>	63
2.14	Größenstandards DNA/Proteine	63
2.15	Enzyme	64
2.16	Antikörper	64
2.17	Verwendete Software	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Morphologische Differenzierung	65
3.1.1	Entwicklung eines Differenzierungsmediums für <i>S. cellulorum</i>	65
3.1.2	Vorbehandlung der Zellen für den Differenzierungsassay	67
3.2	Einfluss von <i>asgA</i> auf die Differenzierung in <i>S. cellulorum</i> So ce56	69
3.2.1	Potenzielle <i>asgA</i> kodierende Gene in <i>S. cellulorum</i> So ce56	70

3.2.1.1	Die <i>asgA/D</i> - Regionen im Genom von <i>S. cellulorum</i> und <i>M. xanthus</i>	72
3.2.2	Konstruktion der <i>S. cellulorum</i> So ce56 <i>asgA</i> - Mutante	72
3.2.2.1	Klonierung des Konjugationsplasmids pSUPHyg <i>asgA</i> und Konjugation nach <i>S. cellulorum</i> So ce56	72
3.2.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>asgA</i> - Mutante von So ce56, <i>SasgA</i>	75
3.2.3.1	Wachstum in Komplexmedium	75
3.2.3.2	Morphologische Differenzierung von <i>SasgA</i>	76
3.2.3.3	Physiologische Differenzierung von <i>SasgA</i>	76
3.2.3.4	Degradation von Cellulose durch <i>SasgA</i>	78
3.2.4	Differenzierungsabhängige Expression von <i>asgA</i> in <i>S. cellulorum</i> So ce56	78
3.2.5	Die <i>asgA</i> - Expression steht unter stringenter Kontrolle	79
3.3	Einfluss der Lon-Proteasen auf die Regulation des Metabolismus von <i>S. cellulorum</i> So ce56	80
3.3.1	Lon-Protease-Homologe im Genom von <i>S. cellulorum</i> So ce56	80
3.3.1.1	Die <i>lon</i> - Regionen im Genom von <i>S. cellulorum</i> und weiteren Organismen	82
3.3.2	Konstruktion der <i>S. cellulorum</i> So ce56 <i>lon</i> - Mutanten	84
3.3.2.1	Klonierung der Konjugationsplasmide pSUPHyg <i>lon1-5</i> und Konjugation nach <i>S. cellulorum</i> So ce56	84
3.3.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>lon</i> - Mutanten von <i>S. cellulorum</i> So ce56	86
3.3.3.1	Wachstum unter vegetativen Bedingungen	86
3.3.3.2	Morphologische Differenzierung der verschiedenen <i>lon</i> - Mutanten von So ce56	88
3.3.3.3	Bestimmung des physiologischen Phänotyps der <i>Slon</i> - Mutanten	90
3.3.3.4	Degradation von Cellulose durch <i>Slon1-5</i>	91
3.3.4	Bestimmung der relativen Expression der <i>lon</i> - Gene von <i>S. cellulorum</i> So ce56	93
3.4	Identifizierung potenzieller Substrate von Lon1 und Lon2 aus <i>S. cellulorum</i> So ce56	94
3.4.1	Präparation von Proteinfractionen von <i>Slon1</i> und <i>Slon2</i> mit nachfolgender MALDI-TOF-Analyse	95
3.4.2	Heparinsäule zur Konzentrierung bzw. Isolierung DNA-bindender Proteine	96
3.4.2.1	Verifizierung des Ergebnisses der MALDI-TOF-Analyse	97
3.5	P_{II} (GlnB) in <i>S. cellulorum</i> So ce56	99
3.5.1	Die <i>glnB</i> - Region im Genom von <i>S. cellulorum</i> So ce56	99
3.5.2	Effekt verschiedener Kohlenstoffquellen auf die GlnB-Akkumulation	101
3.5.3	Modifikation des P_{II} -Proteins aus So ce56 durch Phosphorylierung	103
3.5.3.1	Auswirkung der Stickstofflimitierung auf das Wachstum von So ce56 und <i>Slon2</i>	107
3.5.4	In <i>Slon2</i> ist nur die phosphorylierte P_{II} -Form detektierbar	110

3.5.5	Nutzung von unterschiedlichen Stickstoffquellen	111
3.6	Glutaminsynthetase-Test	113
3.7	Überexpression von Lon2	116
4	Diskussion	119
4.1	Morphologische Differenzierung	119
4.2	Einfluss von <i>asgA</i> auf die Differenzierung in <i>S. cellulosum</i> So ce56	121
4.2.1	Konstruktion von <i>SasgA</i>	121
4.2.2	Phänotypische Charakterisierung von <i>SasgA</i>	123
4.2.2.1	Regulation des <i>asgA</i> - Gens in So ce56	125
4.3	Einfluss der Lon-Proteasen auf die Regulation des Metabolismus von <i>S. cellulosum</i> So ce56	126
4.3.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>lon1-5</i> - Mutanten von So ce56	127
4.3.2	Regulation der <i>lon</i> - Expression in So ce56	130
4.4	Spezifische Substrate der Proteasen Lon1 und Lon2 und deren Rolle im Stick- stoffmetabolismus	131
4.4.1	P_{II} (GlnB) in So ce56	133
4.4.1.1	Phosphorylierung des P_{II} -Proteins in So ce56	134
4.4.1.2	Stickstoffregulation in <i>E. coli</i> und So ce56	135
4.4.1.3	Erhöhte Glutaminsynthetaseaktivität in <i>Slon1</i> und <i>Slon2</i> unter Stickstofflimitierung	137
4.4.1.4	NtcA: ein weiteres potenzielles Substrat der Lon2-Protease?	138
4.4.1.5	Einfluss von Lon1 und Lon2 auf die Stickstoffregulation in <i>S.</i> <i>cellulosum</i> So ce56	139
4.4.2	Überexpression von Lon2	141
5	Ausblick	145
6	Zusammenfassung	147
	Abkürzungsverzeichnis	149
	Veröffentlichungen und Beiträge	165
	Danksagung	167

Tabellenverzeichnis

1.1	Weitere Funktionen von Lon-Proteasen in verschiedenen Organismen	9
1.2	Auflistung bekannter stickstoffregulierter Gene und Vorkommen derer in <i>S. cel-</i> <i>lulosum</i> So ce56 und <i>M. xanthus</i>	11
2.1	Rekombinante Plasmide	15
2.2	Neu konstruierte Plasmide	16
2.3	<i>Escherichia coli</i> Stämme	17
2.4	<i>S. cellulorum</i> Stämme	18
2.5	Weitere Stämme	18
2.6	Medienzusätze	22
2.7	Zusammensetzung der Lösungen für 10 und 12 %ige SDS-Gele	51
2.8	Zusammensetzung der Lösungen für ein 7,5 %iges Nativgel	52
3.1	Homologien der möglichen AsgA/D-homologen Proteine aus <i>S. cellulorum</i> im Vergleich zu AsgA und AsgD von <i>M. xanthus</i>	70
3.2	<i>primer</i> -Kombinationen mit den erwarteten Fragmentgrößen zur Überprüfung der potenziellen <i>asgA</i> -Mutanten	73
3.3	Homologien der möglichen Lon-homologen Proteine aus So ce56 im Vergleich zu LonV und LonD von <i>M. xanthus</i>	81
3.4	Homologien der möglichen Lon-homologen Proteine aus So ce56 im Vergleich zu LonA und LonB von <i>B. subtilis</i> und Lon von <i>E. coli</i>	81
3.5	Für die Klonierung der Konjugationsplasmide pSUPHyg <i>lon1-5</i> verwendete <i>pri-</i> <i>mer</i> und TOPO®-Vektoren.	84
3.6	Für die Konjugation von pSUPHyg <i>lon1-5</i> verwendete <i>E. coli</i> - Stämme (<i>tra</i> ⁺).	86
3.7	Für die Real-time RT-PCR verwendete <i>primer</i> und Fragmentgröße des amplifi- zierten Fragmentes	93
3.8	Homologien der GlnB-homologen Proteine aus <i>E. coli</i> , <i>Synechocystis</i> sp PCC 6803 und <i>Synechococcus elongatus</i> sp. PCC 7942 im Vergleich zu GlnB aus So ce56. Abkürzung aa = <i>amino acids</i>	101
3.9	Gemittelte Ergebnisse des Glutaminsynthetasetestes	115
4.1	Auflistung einiger morphologischer Phänotypen von <i>lon</i> -Mutanten (Δlon) ver- schiedener Organismen	128
4.2	Überblick über <i>rare codons</i> in <i>E. coli</i> und Anzahl vorhandener <i>rare codons</i> in Lon2 von So ce56	143

Abbildungsverzeichnis

1.1	Taxonomie der Myxobakterien (Shimkets et al. 2006).	2
1.2	Fruchtkörper von zwei verschiedenen <i>Sorangium cellulosum</i> -Stämmen.	3
1.3	Gesamtmenge an mikrobiell produzierten Sekundärmetaboliten in %	3
1.4	Chemische Strukturen der Polyketide (a) Chivosazol, (b) Etnangien, (c) Soraphen und (d) Epothilon A.	4
1.5	Lebenszyklen von <i>Myxococcus xanthus</i> und <i>Sorangium cellulosum</i>	5
1.6	Zeitachse der morphologischen Differenzierung von <i>M. xanthus</i>	6
1.7	Aufbau eines klassischen Zwei-Komponentensystems im Vergleich zu AsgA aus <i>M. xanthus</i> . Klassische Zwei-Komponentensysteme sind aus einem Sensorprotein und einem <i>response</i> -Regulator aufgebaut.	7
1.8	Der Mechanismus des ATP-abhängigen Proteinabbaus durch die Lon-Protease.	8
1.9	Das PolyP-bedingte stringente Netzwerk der Proteindegradation.	10
2.1	Schematische Darstellung des Konjugationsvektors pSUPHyg.	29
2.2	Schematischer Aufbau von zwei unterschiedlichen <i>Western Blots</i>	57
3.1	Differenzierungsassay mit unterschiedlichen Verhältnissen von P-Agar zu P-Diff-Agar	66
3.2	Differenzierungsassay auf P-Diff-Agar unter Verwendung von unterschiedlichen Mengen an aufkonzentrierter Zellsuspension von So ce56.	67
3.3	Zeitlicher Verlauf der Differenzierung von So ce56 auf P-Diff-Agar.	68
3.4	Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen von AsgA und AsgD von <i>M. xanthus</i> und fünf AsgA/D-homologen Proteinen aus <i>S. cellulosum</i> basierend auf einer <i>ClustalW</i> -Analyse	71
3.5	Genetische Organisation der <i>asgA/D</i> -Region im Genom von So ce56 und <i>M. xanthus</i>	72
3.6	Graphische Darstellung von pSUPHyg und pSUPHyg <i>asgA</i>	73
3.7	Konstruktion der <i>SasgA</i> -Mutante durch homologe Rekombination von pSUPHyg <i>asgA</i> in das Chromosom So ce56.	74
3.8	Wachstum von So ce56 (Wildtyp) und <i>SasgA</i> in dem Komplexmedium M.	75
3.9	Phänotyp der morphologischen Differenzierung von <i>SasgA</i> im Vergleich zum Wildtyp.	76
3.10	Physiologische Differenzierung von So ce56 (Wildtyp) und <i>SasgA</i>	77
3.11	Degradationsversuch mit So ce56 (Wildtyp) und <i>SasgA</i> auf Cellulose.	78

3.12	Bestimmung der relativen Expression des <i>asgA</i> -Gens in So ce56 und <i>Srel</i> während der Differenzierung durch Real-time RT-PCR.	79
3.13	Phylogenetische Analyse mit den Aminosäuresequenzen verschiedener ausgewählter Lon-Proteasen basierend auf einer <i>ClustalW</i> -Analyse.	82
3.14	Genetische Organisation der <i>lon</i> -Regionen von So ce56, <i>M. xanthus</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	83
3.15	Schematische Darstellung von pSUPHyg <i>lon1</i>	85
3.16	Konstruktion der <i>Slon1</i> -Mutante durch homologe Rekombination von pSUPHyg <i>lon1</i> in das Chromosom von So ce56.	85
3.17	Wachstum von So ce56 (Wildtyp) und <i>Slon1-5</i> in dem Komplexmedium M. . . .	87
3.18	Phänotyp der morphologischen Differenzierung der verschiedenen <i>Slon</i> -Mutanten. . . .	89
3.19	Physiologische Differenzierung von So ce56 (Wildtyp) und <i>Slon1-5</i>	90
3.20	Bestimmung der relativen Expression des <i>chiB</i> -Genes aus <i>S. cellulosum</i> So ce56 und <i>Slon2</i> während der Differenzierung durch Real-time RT-PCR.	91
3.21	Degradationsversuch mit So ce56 (Wildtyp) und <i>Slon1-5</i> auf Cellulose.	92
3.22	Bestimmung der relativen Expression der <i>lon</i> -Gene aus <i>S. cellulosum</i> So ce56 während der Differenzierung durch Real-time RT-PCR.	94
3.23	Ergebnis der SDS-PAGE der Präparation der „Membran“-Fraktion von <i>Slon1</i> (a) und der cytoplasmatischen Fraktion von <i>Slon2</i> (b).	95
3.24	Elutionsprofile der Heparinsäule mit So ce56-Extrakt (a) und <i>Slon2</i> -Extrakt (b). . . .	97
3.25	Ergebnis der 8 %igen SDS-PAGE der nach der Heparinsäule erhaltenen Überstände. . . .	98
3.26	<i>Western Blot</i> -Analyse zur Verifizierung des MALDI-TOF-Ergebnisses.	99
3.27	Phylogenetische Analyse mit den Aminosäuresequenzen ausgewählter <i>P_{II}</i> -Proteine basierend auf einer <i>ClustalW</i> -Analyse.	100
3.28	Vergleich der GlnB-Aminosäuresequenzen aus So ce56, <i>E. coli</i> , <i>Synechocystis</i> sp PCC 6803 und <i>Synechococcus elongatus</i> sp. PCC 7942.	100
3.29	Genetische Organisation der <i>glnB</i> -Region im Genom von So ce56 und <i>E. coli</i>	101
3.30	Produktion von Chivosazol in S-Medium in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle (1 %) (Müller & Gerth 2005).	102
3.31	Einfluss verschiedener C-Quellen auf die Akkumulation von GlnB.	102
3.32	Wachstum von So ce56 in SM-Medium (0,5 % Asparagin; 1 % Maltose).	103
3.33	<i>in vitro</i> Demodifikation von modifiziertem <i>P_{II}</i> aus So ce56.	105
3.34	<i>in vitro</i> Demodifikation von modifiziertem <i>P_{II}</i> aus So ce56.	106
3.35	Vergleich des Wachstums von So ce56 und <i>Slon2</i> in SM-Medium mit unterschiedlichen Konzentration an Asparagin (N-Quelle).	107
3.36	Vergleich des Wachstums von So ce56 in SM-Medium mit 30 mM Stickstoff in Form von Asparagin, Harnstoff, KNO ₃ oder NH ₄ Cl.	108
3.37	Vergleich des Wachstums von So ce56 und <i>Slon2</i> in SM-Medium mit unterschiedlichen Konzentration an KNO ₃ anstelle von Asparagin als Stickstoffquelle. . . .	109
3.38	Wachstum von So ce56 und <i>Slon2</i> in SM-Medium.	110
3.39	<i>Western Blot</i> -Analyse einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese.	111

3.40	Vergleich des Wachstums in SM- bzw. SC-Medium unter Verwendung unterschiedlicher Stickstoffquellen.	112
3.41	Vergleich des Wachstums von So ce56, <i>Slon1</i> und <i>Slon2</i> in SM-Medium mit unterschiedlichen Konzentration an KNO ₃ als Stickstoffquelle.	113
3.42	Wachstum von So ce56, <i>Slon1</i> und <i>Slon2</i> in SM-Medium.	114
3.43	Graphische Darstellung der gemittelten Ergebnisse des Glutaminsynthetasetestes.	115
3.44	12 %ige SDS-PAGE mit Fraktionen der Aufreinigung von Lon2 mit dem C-terminalen Strep-tag.	117
4.1	BLAST-Analyse (<i>SDSC Biology workbench 3.2</i>) von AsgA aus So ce56 gegen AsgA aus <i>M. xanthus</i> (Altschul et al. 1997)	122
4.2	Vegetative und Differenzierungsphänotypen von <i>M. xanthus</i> DK101 (Wt), DK473, <i>S. cellulosum</i> So ce56 (Wt) und <i>SasgA</i> im Vergleich.	124
4.3	Modelle der Kontrolle der Differenzierung	126
4.4	Modell des P _{II} -Systems in der globalen Stickstoffkontrolle in <i>E. coli</i>	135
4.5	Vergleich der NtcA/MrpC-Aminosäuresequenzen aus So ce56, <i>Synechococcus elongatus</i> sp. PCC 7942 und <i>M. xanthus</i>	138
4.6	Modell der Regulation von Phosphorylierung/Dephosphorylierung des P _{II} -Proteins in Cyanobakterien.	140

1 Einleitung

Bakterien sind in der Lage, ihren Metabolismus auf veränderte Umweltbedingungen einzustellen, wodurch dieser immer den Status der äußeren Umwelteinflüsse auf die Bakterien reflektiert. Die äußeren Umwelteinflüsse werden dabei durch Temperatur, Licht, Nährstoffangebot und komplexe Umweltfaktoren, wie z. B. durch die Parameter Sauerstoffverfügbarkeit, Wasserpotential und Besiedlungsdichte, bestimmt. Um das Überleben einer Zelle auch unter Mangelbedingungen zu gewährleisten, reagieren einige Bakterien mit Zelldifferenzierung und der Ausbildung spezieller Strukturen (Bsp.: Fruchtkörperbildung bei Myxobakterien, Endosporenbildung bei *Bacillus*). Dabei wird der Differenzierungsprozess durch intrazelluläre Vorgänge als Reaktion auf Signale aus der Umwelt gesteuert. Die Fähigkeit zur Bildung von komplexen und vielzelligen Strukturen, wie z. B. die der Fruchtkörperbildung von Myxobakterien, beruht auf komplizierten Entwicklungsprozessen, in denen die zeitliche und räumliche Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle einnimmt.

1.1 Myxobakterien

Myxobakterien wurden erstmals im Jahre 1892 von Roland Thaxter beschrieben und werden phylogenetisch in die δ -Gruppe der Proteobakterien eingeordnet (Ludwig et al. 1983). Innerhalb der Gruppe der Myxobakterien (*Myxococcales*) wird zwischen den Unterordnungen Cystobacterineae, Sorangineae und Nannocystineae differenziert (siehe Abb.1.1), deren Familien sich hinsichtlich der Zellmorphologie, Sporenbildung, Koloniestruktur, Fettsäuren und Carotinoide unterscheiden. Der bekannteste Vertreter unter den Myxobakterien ist *Myxococcus xanthus* aus der Unterordnung der Cystobacterineae.

Myxobakterien sind strikt aerobe, mesophile Bodenorganismen, die auf zerfallenem Pflanzenmaterial, verrottendem Holz und Kotballen pflanzenfressender Tiere zu finden sind. Anhand der Ernährungsweise lassen sich Myxobakterien in bakteriolytische und cellulolytische Myxobakterien unterscheiden. Die meisten Arten weisen einen bakteriolytischen Stoffwechsel auf und ernähren sich von eiweißreichem Material sowie durch Lyse von Bakterien und Hefen (Singh 1947), wohingegen nur Vertreter der Sorangineae in der Lage sind, Cellulose zu degradieren. Der Abbau der Makromoleküle erfolgt durch die Sekretion hydrolysierender Enzyme.

Auf der Suche nach Nährstoffen organisieren sich die Myxobakterien in großen Schwärmen und gewährleisten damit, dass durch die hohe Zelldichte hohe lokale Konzentrationen an lytischen Enzymen vorhanden sind. Unter Nährstoffmangelbedingungen bilden sich aus diesen Schwärmergruppen Fruchtkörper, die sich je nach Art hinsichtlich der Form, der Größe oder der Pigmentierung unterscheiden.

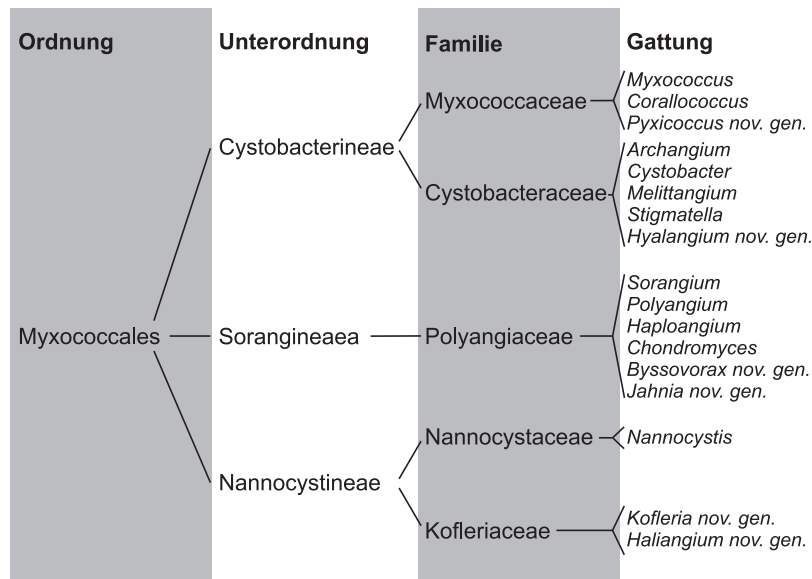


Abbildung 1.1: Taxonomie der Myxobakterien (Shimkets et al. 2006).

Im Wesentlichen zeichnen sich Myxobakterien durch folgende drei Charakteristika aus:

- Bildung von vielzelligen, spezie-spezifischen Fruchtkörpern, deren Formen innerhalb der Gattung variieren.
- Fortbewegung durch Gleiten auf festen Oberflächen, welches zumindest in *M. xanthus* durch zwei Multigenssysteme kontrolliert wird.
- Fähigkeit zur Synthese von biologisch wirksamen Sekundärmetaboliten wie z. B. Epothilone (Gerth et al. 1996).

1.1.1 *Sorangium cellulosum*

Als Myxobakterium ist auch die Gattung *Sorangium* in der Lage, eine morphologische Differenzierung mit der Bildung von Fruchtkörpern zu durchlaufen. Die Fruchtkörper von *S. cellulosum* sind aus einer mehr oder weniger großen Anzahl an Sporangien zusammengesetzt und weisen eine orangefarbene Pigmentierung auf (siehe Abb. 1.2). Die Fruchtkörper liegen als dicht gepackte Haufen auf oder in dem Substrat. Die zelluläre Morphogenese zu Myxosporen ist rudimentär, da diese morphologisch weitgehend den vegetativen Zellen gleichen (Reichenbach 1974).

Sorangium cellulosum gelangte in den letzten Jahren durch die Entdeckung neuartiger Sekundärmetabolite in den Blickpunkt der Forschung (Gerth et al. 2003). Diese meist niedermolekularen Produkte haben häufig eine toxische oder wachstumshemmende Wirkung auf andere Mikroorganismen, Pilze und weitere Eukaryonten.

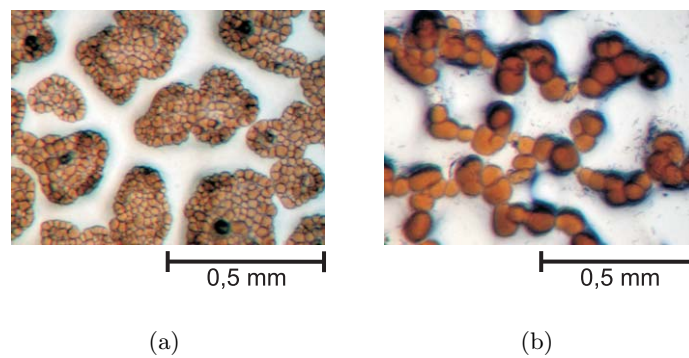


Abbildung 1.2: Fruchtkörper von zwei verschiedenen *Sorangium cellulosum*-Stämmen: (a) Fruchtkörper von So ce56 , (b) Fruchtkörper von So ce DSM 14627.

1.2 Physiologische und morphologische Differenzierung

1.2.1 Physiologische Differenzierung

Auf Grund des komplexen Lebenszyklus stellen die Myxobakterien ein Modellsystem zur Untersuchung der Morphogenese und Differenzierung dar. Doch in den letzten Jahren gewannen die Myxobakterien vor allem wegen ihrer Fähigkeit zur Bildung von Sekundärmetaboliten an Bedeutung. Bis 2001 konnten etwa 80 neue verschiedene Grundstrukturen, sowie 450 Strukturvarianten von Sekundärmetaboliten, aus Myxobakterien isoliert und charakterisiert werden (Reichenbach 2001). Etwa 5 % aller bakterieller Sekundärmetabolite werden von Myxobakterien produziert, womit sie an dritter Stelle hinter den Actinomyceten und Bacillen unter

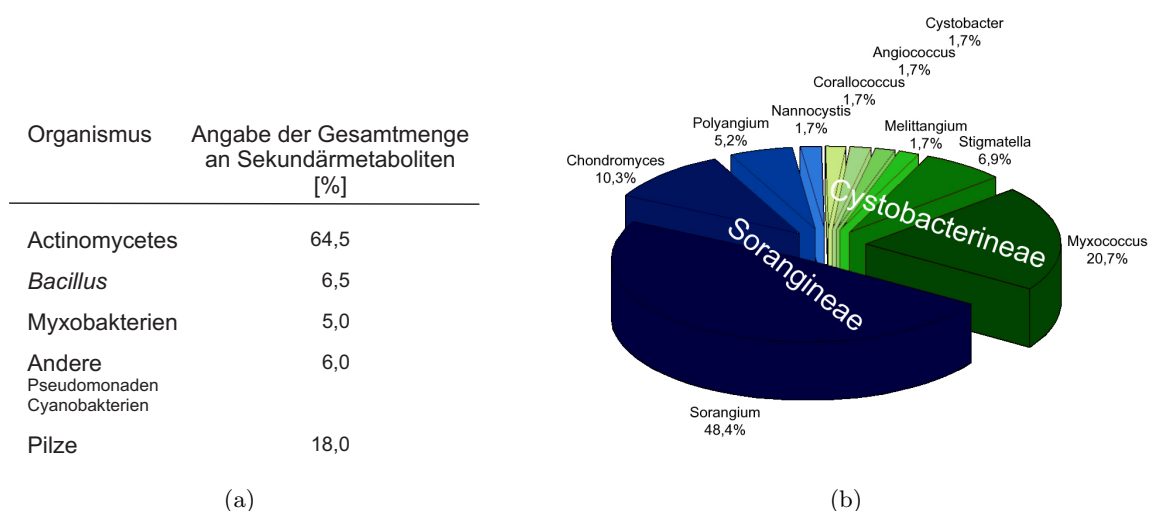


Abbildung 1.3: Gesamtmenge an mikrobiell produzierten Sekundärmetaboliten [%]. (a) Die Gesamtmenge in % bezieht sich auf die produzierten Sekundärmetabolite. (b) Anteil in % und Verteilung der Sekundärmetabolite innerhalb der Gruppe der Myxobakterien (Gerth et al. 2003).

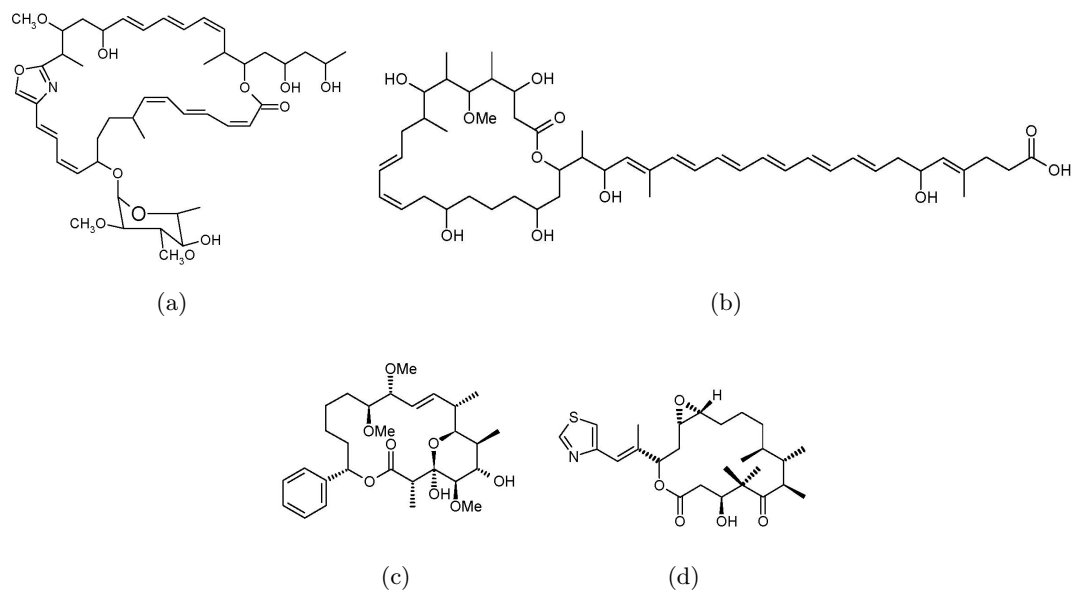


Abbildung 1.4: Chemische Strukturen der Polyketide (a) Chivosazol, (b) Etnangien, (c) Soraphen und (d) Epot-hilon A.

die Produzenten von Sekundärmetaboliten einzuordnen sind (siehe Abb. 1.3(a)). Innerhalb der Gruppe der Myxobakterien stehen die Stämme *Sorangium*, *Myxococcus* und *Chondromyces* an erster Stelle der Sekundärmetabolitproduzenten, wohingegen *Nannocystis* und *Corallococcus* unter den getesteten Bedingungen nur geringe Mengen an Sekundärmetaboliten produzierten (siehe Abb. 1.3(b)). Eine Auswahl an isolierten Naturstoffen ist in Abbildung 1.4 gezeigt.

Viele dieser bioaktiven Naturstoffe werden durch Polyketidsynthetasen (PKS) und nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) synthetisiert (Beyer et al. 1999, Silakowski et al. 2001). Die bakteriellen Polyketide (TypI) sind multifunktionale Enzymkomplexe, die kurzketige Carbonsäuren stufenweise miteinander verknüpfen. Diesem ähnlich sind die nichtribosomalen Peptidsynthetasen, die in Konvergenz zu den Polyketidsynthetasen Aminosäuren nichtribosomal miteinander verknüpfen. Die Produkte dieser Biosynthesewege werden in Analogie zu den Enzymkomplexen als Polyketide bzw. nichtribosomale Polypeptide bezeichnet.

Als Startermoleküle für die Biosynthese von Polyketiden werden neben Acetyl-CoA viele verschiedene über Coenzym A aktivierte Moleküle gefunden. Des Weiteren können mögliche Startermoleküle auch aus dem Aminosäurestoffwechsel stammen (Moore & Hertweck 2002).

Die Produktion von Sekundärmetaboliten wird durch den Abbau von Nährstoffen, Biosynthese oder Zugabe von Induktoren und/oder durch schlechte Wachstumsraten ausgelöst. Diese Ereignisse generieren Signale, die eine Kaskade von regulatorischen Prozessen auslösen, welche letztlich in physiologischer und morphologischer Differenzierung enden (Demain 1998). Dieses Zusammenspiel von morphologischer und physiologischer Differenzierung konnte bei vielen Organismen beobachtet werden. So verläuft z. B. bei Streptomyceten und Bacillen die Sporulation parallel zu physiologischen Differenzierungen ab (Lengeler et al. 1999, Marahiel et al. 1993). Solch ein Zusammenhang zwischen Sekundärmetabolismus und morphologischer Differenzierung

konnte auch in *M. xanthus* festgestellt werden (Rosenberg et al. 1973). Für *M. xanthus* scheint das Zusammenspiel zwischen morphologischer und physiologischer Differenzierung jedoch nicht notwendig zu sein, da auch in Mutanten, welche in der Fruchtkörperbildung gestört sind, Sekundärmetabolite produziert werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sowohl bei den Streptomyceten als auch bei *M. xanthus* die Produktion von Sekundärmetaboliten in Flüssigkulturen unabhängig von der morphologischen Differenzierung verläuft (Reichenbach 1993).

1.2.2 Morphologische Differenzierung

Myxobakterien zeichnen sich durch einen zweigeteilten Lebenszyklus aus (siehe Abb. 1.5). Unter guten Wachstumsbedingungen wachsen sie vegetativ in Schwärmen, während unter Nährstoffmangelbedingungen eine kooperative Morphogenese stattfindet, die letztlich mit der Bildung von multizellulären Fruchtkörpern endet. Für die Differenzierung zu Fruchtkörpern sammeln sich die Zellen zunächst an sogenannten Aggregationszentren und bilden Zellaggregate, aus denen sich schließlich die Fruchtkörper entwickeln. Innerhalb des Fruchtkörpers entwickeln sich die Zellen im Zuge einer zellulären Morphogenese zu metabolisch inaktiven Myxosporen. Diese sind im Fruchtkörper gegen Austrocknung, Schallvibrationen, Hitze und UV-Strahlen geschützt. Außerhalb des Fruchtkörpers bleiben die Zellen stäbchenförmig oder lysieren. Unter adäquaten Bedingungen können die Myxosporen dann wieder zu Schwärmen vegetativer Zellen auskeimen und sichern damit das Überleben der Art (Dworkin 1996).

Dem Verlauf der Differenzierung und Entwicklung von Myxobakterien liegt ein stark geordnetes System der Genexpression zu Grunde, welches den Austausch von diffusiblen Signalsubstanzen und den direkten Zell-Zellkontakt für die Steuerung erfordert. In *M. xanthus* wurden anhand von Komplementationsversuchen fünf Signale (A, B, C, D und E-Signal) postuliert, die

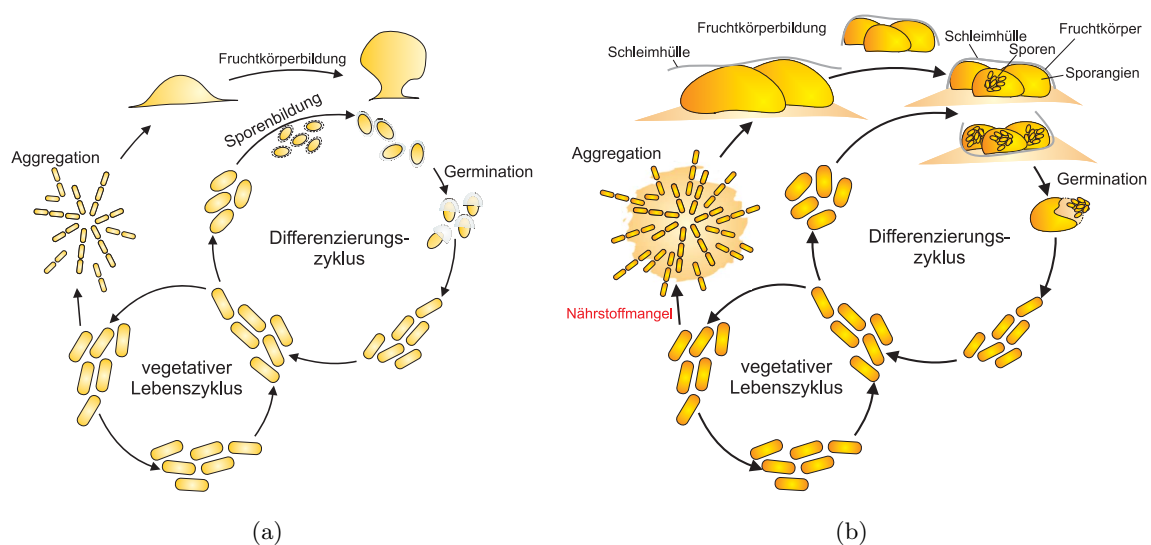


Abbildung 1.5: (a) Lebenszyklus von *Myxococcus xanthus* und (b) Lebenszyklus von *Sorangium cellulosum* in Anlehnung an Dworkin (1996).

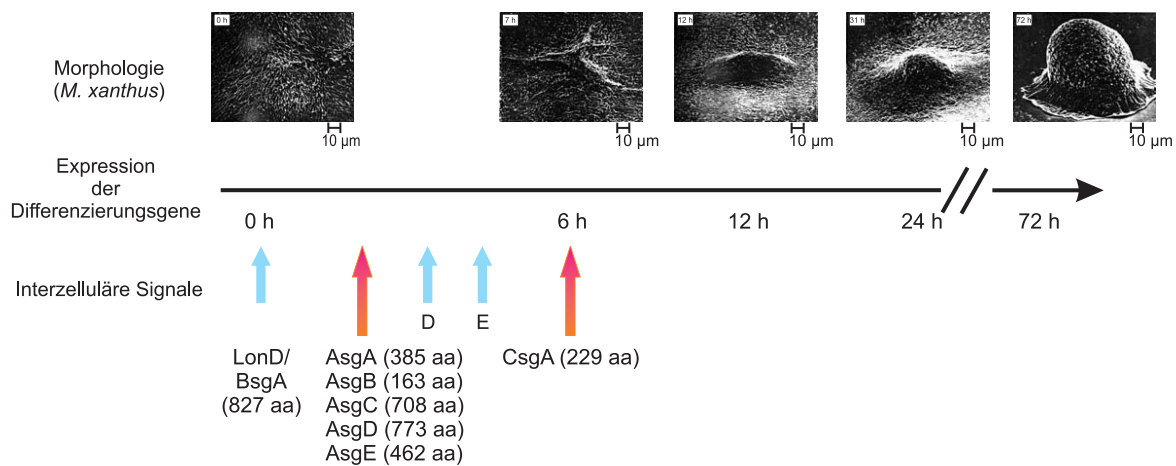


Abbildung 1.6: Zeitachse der morphologischen Differenzierung von *M. xanthus*. Das zeitliche Einsetzen der durch Komplementationsversuche identifizierten Signale (A, B, C, D, und E-Signal) wird durch die bunten Pfeile veranschaulicht (Sogaard-Andersen et al. 2003). Die roten Pfeile verdeutlichen die biochemisch und funktionell bestätigten Signale, wohingegen für die blauen Pfeile noch keine eindeutige Signalwirkung bestätigt werden konnte. Fotos: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines *M. xanthus*-Schwarms während der Aggregation zu einem Fruchtkörper (Kuner & Kaiser 1982).

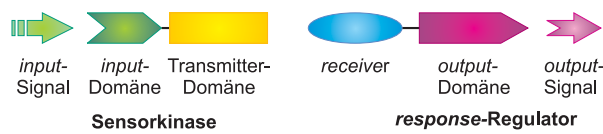
für den normalen Verlauf der Entwicklung und Differenzierung erforderlich sein sollen (LaRossa et al. 1983, Downard et al. 1993). Bisher konnten jedoch nur zwei Signale (A-Signal und C-Signal) biochemisch und funktionell verifiziert werden. Als Initiationssignal für die Differenzierung konnte (p)ppGpp ermittelt werden (Singer & Kaiser 1995).

A-Signal: Das A-Signal sorgt unter Nährstoffmangelbedingungen dafür, dass die Fruchtkörperbildung erst initiiert wird, nachdem eine große Anzahl an hungernden Zellen erreicht ist. In *M. xanthus* wurden fünf unterschiedliche *asg*-Gene identifiziert und charakterisiert. In jeder Mutante, die einen Defekt in der A-Signal-Produktion aufweist, ist dies auf eine Mutation in einem der fünf Gene zurückzuführen (Kuspa & Kaiser 1989, Kaiser 2004).

Das *asgA*-Gen kodiert ein Signaltransduktionsprotein, aufgebaut aus einer N-terminalen *receiver*-Domäne und einer C-terminalen Histidinkinase-Domäne. Für das Genprodukt AsgA konnte eine Autokinase-Aktivität nachgewiesen werden. Auf Grund des Fehlens der für die Sensorkinase charakteristischen *input*-Domäne sowie der *output*-Domäne des *response*-Regulators, wurde angenommen, dass AsgA Teil eines *phosphorelay*-Systems ist, in dem andere Proteine die Funktionen der *input*- und *output*-Domäne zu Verfügung stellen (Plamann et al. 1995, Li & Plamann 1996, Kaiser 2004). Diese beiden Domänen sind in klassischen Zwei-Komponentensystemen für die Signalaufnahme (*input*-Domäne) bzw. für die Signalweiterleitung (*output*-Domäne) zuständig (siehe dazu Abb. 1.7).

Das *asgB*-Gen kodiert ein putatives DNA-Bindeprotein mit einem *helix-turn-helix*-Motiv (HTH), welches dem HTH-Motiv der Region 4 des Hauptsigmafaktors aus *E. coli*, *B. subtilis* und *M. xanthus* ähnelt (Plamann et al. 1994, Kaiser 2004). Diese Region ist für die Erkennung der prokaryontischen -35-Promotorregion wichtig. Das Genprodukt von *asgC* ist der

Klassisches Zwei-Komponenten-System



AsgA:

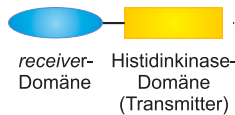


Abbildung 1.7: Aufbau eines klassischen Zwei-Komponentensystems im Vergleich zu AsgA aus *M. xanthus*. Klassische Zwei-Komponentensysteme sind aus einem Sensorprotein und einem *response*-Regulator aufgebaut.

Hauptsigmafaktor SigA von *M. xanthus* (Davis et al. 1995, Kaiser 2004). Wie *asgA* so kodiert auch *asgD* ein Signaltransduktionsprotein, welches die gleichen Domänen wie AsgA aufweist (Cho & Zusman 1999, Kaiser 2004). Das Genprodukt von *asgE* wiederum ist homolog zu Amidohydrolase-Proteinen und besitzt zwei membranübergreifende putative Domänen (Garza et al. 2000, Kaiser 2004). Da eine Mutation oder das Fehlen eines einzelnen der fünf *asg*-Gene zu einer Verringerung in der A-Signal-Produktion führt, geht man davon aus, dass alle fünf Gene in dem gleichen Signalweg involviert sind (Kaiser 2004).

„B-Signal“: Das „B-Signal“ konnte bisher noch nicht biochemisch und funktionell bestätigt werden. Doch konnte für *bsgA* ($\hat{=}$ *lonD*) gezeigt werden, dass es ebenfalls eine wichtige Rolle in der Differenzierung von *M. xanthus* einnimmt (Tojo et al. 1993, Kaiser 2004). Das Gen *bsgA* kodiert eine ATP-abhängige Lon-Protease (LonD) mit Homologien zu weiteren Lon-Orthologen (siehe Abb. 3.13). Von Gill et al. (1993) wurde postuliert, dass *bsgA*-Mutanten einen Defekt in der intrazellulären Proteolyse aufweisen, die normalerweise für den Abbau von Repressoren der Differenzierung zuständig ist. LonD spielt in *M. xanthus* eine wichtige Rolle bei der Proteolyse des Transkriptionsregulators MrpC (Ueki & Inouye 2006).

1.3 Proteasen

In allen Organismen sind ATP-abhängige Proteasen vorhanden und üben dort, unter Energieverbrauch durch Hydrolyse von ATP, eine zentrale Funktion bei der Qualitätskontrolle und Regulation zellulärer Prozesse aus. Unter dem Begriff Qualitätskontrolle versteht man dabei ein für Zellen lebensnotwendiges Gleichgewicht von Proteinsynthese, Faltung und Entsorgung beschädigter Polypeptide (Wickner et al. 1999).

1.3.1 Lon-Proteasen

Die ATP-abhängige und im Cytoplasma lokalisierte Lon-Protease von *E. coli* katalysiert die initialen Schritte der Degradation abnormer Proteine und einer Vielzahl wichtiger instabiler Regulationsproteine der Zelle, wie z. B. Sula (Zellteilungsregulator; Mizusawa & Gottesman

(1983)) und RscA (Transkriptionsaktivator der Synthese kapsulärer Proteine; Torres-Cabassa & Gottesman (1987)) aus *E. coli*. Auf diese Weise greift die Lon-Protease in verschiedene physiologische Vorgänge, wie die Zellteilung oder Bildung kapsulärer Polysaccharide, ein. Des Weiteren spielt sie eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle durch Degradation missgefalteter Proteine, die ansonsten Aggregate bilden würden (Goldberg 1992, Gottesman 1996, Tsilibaris et al. 2006).

Die Lon-Protease aus *E. coli* baut sich in ihrer aktiven Form aus mehreren identischen und 87 kDa großen Untereinheiten auf. Jede der Untereinheiten ist aus drei Domänen aufgebaut: der N-terminalen Domäne, welche vermutlich für die Erkennung und Bindung von Proteinsubstraten zuständig ist, der zentralen ATPase-Domäne mit der Fähigkeit neben ATP auch Polyphosphat und DNA binden zu können und der C-terminalen Domäne, die einen katalytisch aktiven Serinrest (S679) besitzt. Somit sind sowohl die ATPase-Domäne als auch die proteolytisch aktiven Stellen der Lon-Protease auf ein und derselben Polypeptidkette lokalisiert (Tsilibaris et al. 2006). Kristallisation der C-terminalen Domäne der *E. coli* Lon-Protease lässt den Schluss zu, dass Lon ein ringförmiges Hexamer bildet.

Die Lon-Protease wird zu den Serinproteasen gezählt, weist jedoch im Vergleich zu den klassischen Serinproteasen wie viele anderen ATP-abhängige Proteasen eine geringere Sensitivität gegenüber dem Serinproteaseinhibitor DFP (Diisopropylfluorophosphanat) auf (Gottesman & Maurizi 1992).

Die vermutlich wichtigste regulatorische Eigenschaft der Lon-Protease aus *E. coli* besteht aus der Interaktion der Protease mit Proteinsubstraten und der daraus folgenden allosterischen Aktivierung der Protease (Goldberg 1992). Goldberg (1992) beschrieb folgendes Modell des Mechanismus des ATP-abhängigen Proteinabbaus durch die Lon-Protease (siehe auch Abb. 1.8):

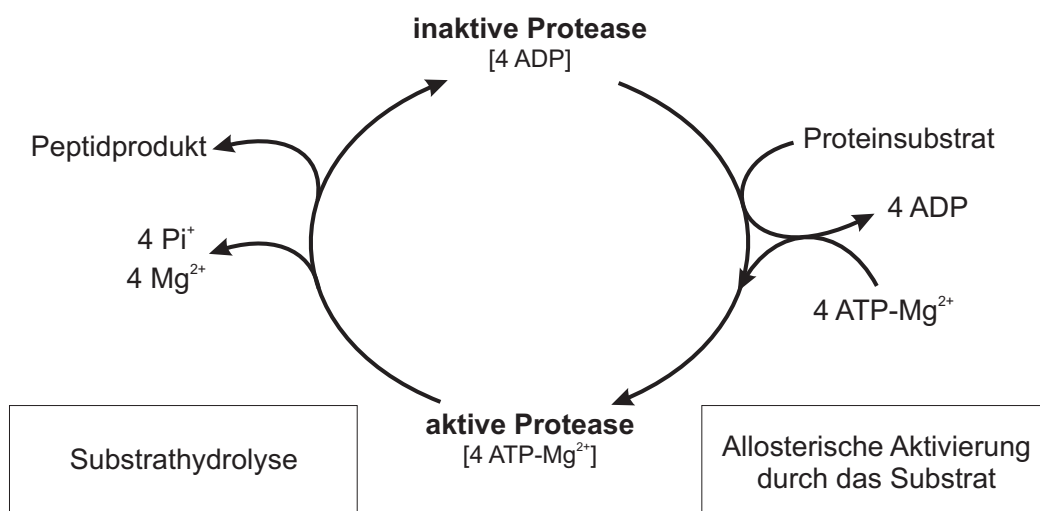


Abbildung 1.8: Der Mechanismus des ATP-abhängigen Proteinabbaus durch die Lon-Protease. Die Interaktion des Substrats mit der allosterischen Bindestelle des Proteins führt zur Freisetzung von ADP und der partiellen Aktivierung der Protease. Durch die Bindung von ATP-Mg an die Protease nimmt die Aktivierung des Enzyms weiter zu. Die Hydrolyse von ATP zu ADP ermöglicht in noch unbekannter Form die Degradation von Proteinen. Im aktiven Zustand kommt es zum maximalen Proteinabbau kleinerer Peptide, wohingegen für die Degradation größerer Peptide mehrere Zyklen des Kreislaufs erforderlich sind (Goldberg 1992).

In vivo sind vier Moleküle ADP an die Protease gebunden, die bis zum Auftreten eines geeigneten Substrates die Funktion der Protease inhibieren. Durch Bindung potenzieller Proteinsubstrate an das allosterische Zentrum der Protease wird ADP freigesetzt. Nach Freisetzung des ADP können die nun offenen Stellen mit ATP und Magnesium besetzt werden, was zur Isomerisierung der Protease in die aktive Form führt. Die nun „aktive“ Protease katalysiert unter Hydrolyse von ATP zu ADP die endoproteolytische Spaltung der Substrate in Produkte aus 10 bis 20 Aminosäuren (Maurizi 1992). Das entstehende ADP führt dann letztlich wieder zur Inaktivierung der Protease (Goldberg 1992).

Das ATP fungiert als allosterischer Effektor der Protease und scheint weniger für die Spaltung von Peptidbindungen, als vielmehr für die richtige Interaktion zwischen dem aktiven Zentrum der Protease und dem Substrat wichtig zu sein, da auch in Abwesenheit von ATP kleinere Peptide durch die Lon-Protease gespalten werden können und die proteolytische Aktivität keine Hydrolyse von ATP benötigt. Doch vor allem für hochmolekulare Proteine scheint eine ATP-abhängige Proteolyse durch Lon erforderlich zu sein (Gottesman & Maurizi 1992, Goldberg 1992).

Da der Proteinabbau unter normalen Bedingungen auch in Abwesenheit der Lon-Protease von anderen Proteasen übernommen werden kann, scheint die Lon-Protease nicht essentiell notwendig für die Überlebensfähigkeit der Zelle zu sein (Goldberg 1992, Gottesman & Maurizi 1992, Tsilibaris et al. 2006). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in *lon*-Mutanten verschiedener Spe-

Tabelle 1.1: Weitere Funktionen von Lon-Proteasen in verschiedenen Organismen

Organismus	Funktion der Lon-Protease	spez. Substrat	Referenz
<i>Azospirillum brasilense</i>	Regulation der Eisenaufnahme	?	Mori et al. (1996)
<i>Bacillus subtilis</i>	Regulation der Sporulation	σ^G ?	Schmidt et al. (1994)
<i>Caulobacter crescentus</i>	Regulation des Zellzyklus	CcrM	Wright et al. (1996)
<i>Myxococcus xanthus</i>	Regulation der Fruchtkörperbildung und Sporulation	MrpC	Ueki & Inouye (2006)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Biosynthese lateraler Flagellen	?	Stewart et al. (1997)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	essentiell für die Virulenz und bei der Ausbildung einer systemischen Infektion von Bedeutung	HilC; HilD	Takaya et al. (2005)

zies, verschiedene zelluläre Defekte auftreten (Tsilibaris et al. 2006). So weisen z. B. *E. coli lon*-Mutanten eine mukoide Koloniemorphologie auf und zeichnen sich des Weiteren durch eine erhöhte Sensibilität sowohl gegenüber UV-Strahlung als auch gegenüber anderen DNA-schädigenden Substanzen aus (Ebel et al. 1999). Beide Phänotypen lassen sich auf die beiden zuvor schon erwähnten spezifischen Substrate der Lon-Protease in *E. coli*, RscA und Sula, zurückführen. So kommt es in Abwesenheit der Lon-Protease in *E. coli* zur Anreicherung von RscA, das als Transkriptionsaktivator jene Gene aktiviert, die für die Synthese kapsulärer Polypeptide verantwortlich sind, was wiederum zu dem mukoidem Phänotyp führt (Torres-Cabassa & Gottesman 1987).

Die erhöhte Sensibilität gegenüber DNA-Schädigungen unterschiedlicher Art lässt sich auf die Akkumulation des Zellteilungsinhibitors Sula zurückführen, welcher im Zuge der SOS-Antwort vermehrt gebildet wird. Akkumulation von Sula führt über die Inhibition der Zellteilung letztendlich zum Absterben der Zellen (Gottesman 1996). In Tabelle 1.1 sind weitere Funktionen von Lon-Proteasen in verschiedenen Organismen aufgeführt.

Neben der Aufgabe der Proteinqualitätskontrolle und der Regulation der Aktivität einiger

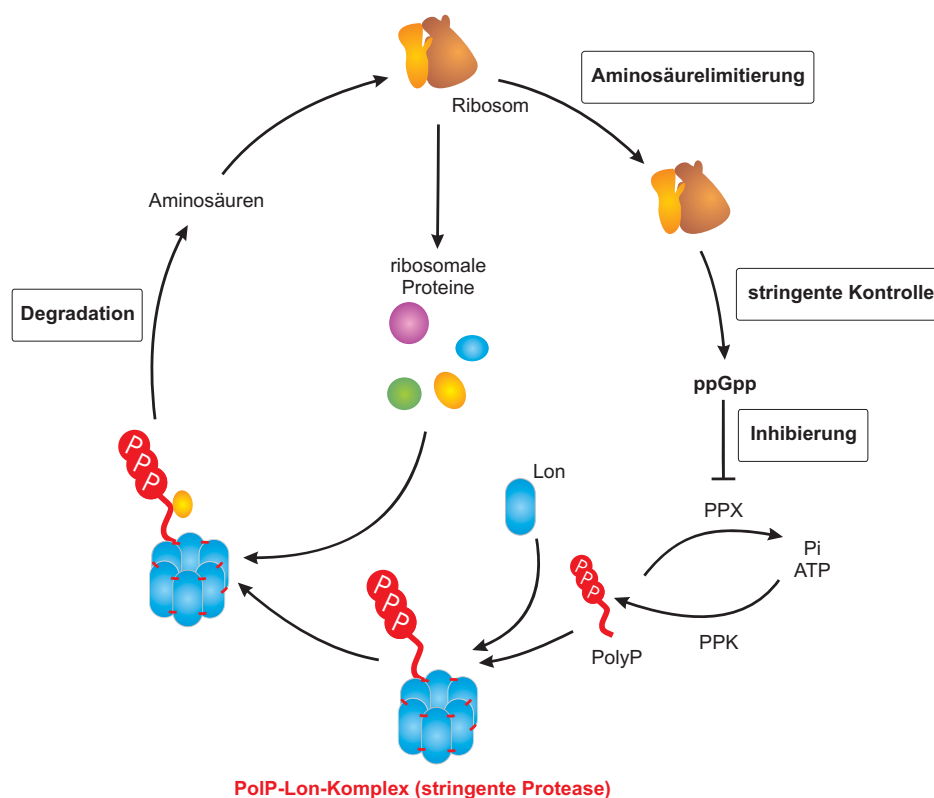


Abbildung 1.9: Das PolyP-bedingte stringente Netzwerk der Proteindegradation (Kuroda 2006). Während Aminosäurelimitierung in *E. coli* kommt es im Rahmen der stringenten Kontrolle zu einer ansteigenden Produktion von (p)ppGpp, was die Aktivität von PPX (Exopolyphosphatase) inhibiert. In der exponentiellen Phase ist das Niveau an PolyP sehr niedrig, doch als Antwort auf Aminosäuremangel erhöht es sich um das 100fache. Das PolyP bildet zusammen mit der ATP-abhängigen Lon-Protease einen Komplex, der freie ribosomale Proteine degradiert. Mit Hilfe von cytoplasmatischen Peptidasen werden die durch die Degradation des PolyP-Lon-Komplexes entstandenen kurzen Polypeptide in einzelne Aminosäuren zerlegt. Damit stehen der Zelle auch unter Nährstoffmangelbedingungen wieder Aminosäuren zur Neusynthese von Proteinen zu Verfügung.

wichtiger Regulationsproteine spielt die Lon-Protease auch in der Bereitstellung von Bausteinen für die Proteinsynthese und sogar auf Translationsebene eine entscheidende Rolle. So kommt es in *E. coli* unter Aminosäurelimitierung zu einer Anhäufung von unbeladenen tRNAs und Ribosomen, an denen aus Mangel an freien Aminosäuren die Translation gestoppt ist (siehe Abb. 1.9). Daraufhin steigt als *stringent response* die Synthese von (p)ppGpp (Guanosintetraphosphat), wodurch es durch die Inhibierung des Polyphosphat-abbauenden Enzyms Exopolyphosphatase zu einer Akkumulation von Polyphosphat kommt. Das PolyP bildet mit der Lon-Protease einen Komplex und ermöglicht es damit der Lon-Protease, im Komplex mit PolyP freie ribosomale Proteine zu degradieren. Somit ermöglicht die Lon-Protease eine kurzzeitige Kompensierung des Aminosäuremangels und die Adaptation an die veränderten Bedingungen (Tsilibaris et al. 2006, Kuroda 2006).

1.4 Stickstoffregulation in Myxobakterien

Die Myxobakterien *M. xanthus* und *S. cellulorum* unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht voneinander. So ist *M. xanthus* auf die Bereitstellung von Aminosäuren als Energiequelle angewiesen, wohingegen *S. cellulorum* in der Lage ist, ganze Polysaccharide als Energiequelle zu nutzen (Shimkets et al. 2006). Des Weiteren besteht ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Spezies in Bezug auf die Initiation der Differenzierung. Da *S. cellulorum* für das Wachstum sowohl Stickstoff, in Form von z. B. Nitrat oder Ammonium, als auch Kohlenstoff nutzt, wird die Differenzierung vor allem durch diese beiden elementaren Stoffe eingeleitet. Anders verhält es sich bei *M. xanthus*, der wie zuvor erwähnt auf Aminosäuren angewiesen ist, um seinen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus zu decken und dementsprechend unter aminosäurelimitierenden Bedingungen mit der Differenzierung beginnt.

Da *S. cellulorum* als Antwort auf Stickstoff- und Kohlenstofflimitierung mit der Differenzierung zu Fruchtkörpern reagiert, deutet dies auf das Vorhandensein eines globalen Stickstoffregulationssystems hin. Durch Analysen im Genom von So ce56 konnten folgende Gene des aus anderen Bakterien bekannten Stickstoffmetabolismus identifiziert werden (siehe auch Tab. 1.2):

Tabelle 1.2: Auflistung bekannter stickstoffregulierter Gene und Vorkommen derer in *S. cellulorum* So ce56 und *M. xanthus*. Die aufgelisteten Gene wurden in anderen Bakterien als stickstoffregulierte Gene identifiziert.

stickstoffregulierte Gene	<i>S. cellulorum</i> So ce56	<i>M. xanthus</i>
<i>glnA</i>	<i>sce7210</i>	mxan0912
<i>glnB</i>	<i>sce7211</i>	nicht vorhanden
<i>glnD</i>	<i>sce341</i>	nicht vorhanden
<i>glnE</i>	<i>sce1766</i>	nicht vorhanden
<i>ntcA</i>	<i>sce3757</i>	nicht vorhanden

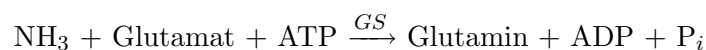
glnA (kodiert die Glutaminsynthetase I), *glnB* (kodiert das P_{II} -Protein), *glnD* (kodiert die Uridyltransferase) und *glnE* (kodiert die Adenylyltransferase). In *M. xanthus* hingegen konnten außer *glnA* keine weiteren Gene des Stickstoffmetabolismus identifiziert werden. Somit gibt es keine weiteren Hinweise bezüglich des Vorhandenseins einer globalen Stickstoffregulation in *M. xanthus*.

Das Vorhandensein dieser wichtigen Gene in *S. cellulorum* lässt den Schluss zu, dass der Stickstoffmetabolismus ähnlich wie in *E. coli* oder Cyanobakterien geregelt wird. Weitere Details hinsichtlich des Stickstoffmetabolismus in *S. cellulorum* sind jedoch bisher nicht bekannt.

1.4.1 Stickstoffmetabolismus

Stickstoff ist eines der wichtigsten Elemente des Lebens, da es für die Synthese von lebensnotwendigen Bausteinen wie Aminosäuren, Nukleotiden oder NAD benötigt wird. Auf Grund dessen entwickelten die Bakterien eine Anzahl von Mechanismen, um den Stickstoff aus den unterschiedlichsten Stickstoffquellen zu verwerten. Die nutzbaren Stickstoffquellen reichen von Ammonium (NH_4) bis hin zu elementarem Stickstoff (N_2), wobei Ammonium für Bakterien die bevorzugte Stickstoffquelle darstellt, da es direkt in die beiden entscheidenden Donoren für biosynthetische Reaktionen, Glutamin und Glutamat, überführt werden kann. Andere Stickstoffquellen hingegen müssen entweder zu Ammonium degradiert werden oder aber zu Ammoniak reduziert werden (Arcondéguy et al. 2001). In Abhängigkeit von den vorhandenen Stickstoffquellen werden unterschiedliche Enzyme und Transportsysteme aktiviert. Dabei ermöglichen die verschiedenen Mechanismen zur Stickstoffverwertung diejenigen Stickstoffverbindungen vorzuziehen, die mit geringem Energieverlust aufgenommen und verwertet werden können.

Der wichtigste Weg für die Umwandlung von Stickstoff bzw. Ammonium ist der **Glutaminsynthetase/Glutamin-Oxoglutarat-Amido-Transferase-Weg** (GS/GOGAT). Dabei erfolgt die durch die Glutaminsynthetase katalysierte Umwandlung von Glutamat und Ammonium zu Glutamin. Die Amidogruppe des Glutamins wird durch die Ferredoxin-abhängige Glutaminsynthase unter Bildung von zwei Molekülen Glutamat auf α -Ketoglutarat übertragen (Merrick & Edwards 1995). Anschließend wird eines der beiden entstandenen Glutamatmoleküle wieder innerhalb des GS/GOGAT-Zyklus aminiert. Damit entsteht netto aus einem Molekül Ammonium und α -Ketoglutarat ein Molekül Glutamat.



Einen weiteren alternativen Weg zur Stickstoffassimilation stellt der Glutamat-Dehydrogenase-Weg dar, der von vielen Bakterien, wie z. B. den Enterobakterien, genutzt wird. Dabei wird die Umwandlung von α -Ketoglutarat und Ammonium durch die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert. Diese Reaktion ist NADPH-abhängig (Arcondéguy et al. 2001).

Die beiden Reaktionen unterscheiden sich in zwei Punkten voneinander. Die Glutamat-Dehydrogenase arbeitet energetisch günstiger als die GS/GOGAT, hat jedoch eine geringere Affinität für Ammonium. Daher ist die Glutamat-Dehydrogenase in Zellen, die unter stickstofflimitierenden Bedingungen wachsen, nicht aktiv (Arcondéguy et al. 2001).

In *S. cellulosum* und *M. xanthus* sind sowohl mehrere Gene vorhanden, die Glutamatdehydrogenase-homologe Proteine kodieren als auch mehrere Gene, die Glutaminsynthetase-homologe Proteine kodieren.

1.4.2 P_{II}-Proteine

Die P_{II}-Proteine sind weit verbreitete und hochkonservierte Signaltransduktionsproteine, die nicht nur in Bakterien (Arcondéguy et al. 2001), sondern auch in Archaea (Kessler et al. 2001), sowie in den Chloroplasten eukaryontischer Algen und höherer Pflanzen (Moorhead & Smith 2003) zu finden sind. Die P_{II}-Proteine spielen eine zentrale Rolle in der Koordination des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus (Magasanik 2000). Dabei besteht die Funktion der P_{II}-Proteine darin, Signale im Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus zu erkennen und weiterzuleiten, und damit unter anderem die Transkription und Aktivität der Glutaminsynthetase zu regulieren. Neben der Unterfamilie GlnB sind in der P_{II}-Proteinfamilie noch zwei weitere Unterfamilien vertreten, GlnK und NifI. Im Vergleich zu GlnB und GlnK, deren Homologe häufig vertreten sind, kommen NifI-Homologe nur in Archaea und einigen strikt anaeroben Bakterien vor (Forchhammer 2004). In *S. cellulosum* So ce56 konnte ein P_{II}-homologes Gen identifiziert werden.

1.5 Zielstellung

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die Sekundärmetabolitproduktion eine Reaktion des produzierenden Organismus auf veränderte Umweltbedingungen ist. Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Analyse der morphologischen und physiologischen Differenzierung in So ce56 sowie die Interaktion beider Differenzierungswege. Dafür war es für weitere Untersuchungen notwendig, zunächst einen geeigneten Differenzierungsassay für *S. cellulosum* So ce56 zu etablieren, da bisherige Arbeiten bezüglich der morphologischen Differenzierung fast ausschließlich an *M. xanthus* durchgeführt wurden.

Analysen des Genoms von So ce56 ergaben, dass eine große Übereinstimmung zu den aus *M. xanthus* bekannten Differenzierungsgenen *asgA* sowie *bsgA* ($\hat{=}$ *lonD*) besteht. Es konnten ein *asgA*-homologes Gen sowie fünf *lon*-homologe Gene in So ce56 identifiziert werden. Ausgehend davon wurden insgesamt sechs Mutanten in So ce56 mittels homologer Rekombination konstruiert, deren Rolle in der morphologischen und physiologischen Differenzierung von So ce56 untersucht werden sollte. Weiterhin war es von Interesse, potenzielle Substrate der fünf in So ce56 gefundenen Lon-Proteasen zu identifizieren, da Lon-Proteasen unter anderem für die Degradation von Regulationsproteinen (Bsp.: SulA in *E. coli*) bekannt sind. Dies sollte unter anderem weiteren Aufschluss über die Beteiligung der Lon-Proteasen an der Differenzierung von So ce56 ergeben.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmide und Organismen

In Tabelle 2.1 sind die für diese Arbeit verwendeten rekombinanten Plasmide und in Tabelle 2.2 die neu konstruierten Plasmide aufgeführt. Die für diese Arbeit herangezogenen *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Des Weiteren sind in Tabelle 2.4 die verwendeten und neu konstruierten *S. cellulosum*-Stämme, sowie in Tabelle 2.5 weitere verwendete Stämme aufgeführt.

Tabelle 2.1: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pASK-IBA3	MCS, Amp ^r , tet _R , P _{tet} , Expressionsvektor (C-terminales Strep-tag II-Peptid)	IBA, Göttingen
pCR®-XL-TOPO®	Klonierungsvektor; T7 und Sp6-Promotor für <i>in vitro</i> Transkription; linearisiert; 3'-T-Überhang; <i>Vaccinia</i> -Topoisomerase I an 3'-Enden; Kan ^R ; Amp ^R	Invitrogen
pCR®-BLUNT II-TOPO®	Klonierungsvektor; T7 und Sp6-Promotor für <i>in vitro</i> RNA Transkription; linearisiert; <i>Vaccinia</i> -Topoisomerase I an 3'-Enden; <i>ccdB</i> -Gen; Kan ^R ; Zeocin TM R	Invitrogen
pSUPHyg	<i>mob</i> , ColE1, <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aphIIp</i> , Tet ^R , BamHI und HindIII singulär	Knauber (2004)

Tabelle 2.2: Neu konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCR [®] -XL-TOPO [®] <i>asgA</i>	pCR [®] -XL-TOPO [®] mit einem internen <i>asgA</i> -PCR-Fragment von So ce56	diese Arbeit
pCR [®] -XL-TOPO [®] <i>lon1</i>	pCR [®] -XL-TOPO [®] mit einem internen <i>lon1</i> -PCR-Fragment von So ce56	diese Arbeit
pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] <i>lon2</i>	pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] mit einem internen <i>lon2</i> -PCR-Fragment von So ce56	diese Arbeit
pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] <i>lon3</i>	pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] mit einem internen <i>lon3</i> -PCR-Fragment von So ce56	diese Arbeit
pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] <i>lon4</i>	pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] mit einem internen <i>lon4</i> -PCR-Fragment von So ce56	diese Arbeit
pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] <i>lon5</i>	pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] mit einem internen <i>lon5</i> -PCR-Fragment von So ce56	diese Arbeit
pSUPHyg <i>asgA</i>	pSUPHyg mit 870 bp großem Fragment, welches das interne <i>asgA</i> -Fragment enthält	diese Arbeit
pSUPHyg <i>lon1</i>	pSUPHyg mit 830 bp großem Fragment, welches das interne <i>lon1</i> -Fragment enthält	diese Arbeit
pSUPHyg <i>lon2</i>	pSUPHyg mit 948 bp großem Fragment, welches das interne <i>lon2</i> -Fragment enthält	diese Arbeit
pSUPHyg <i>lon3</i>	pSUPHyg mit 951 bp großem Fragment, welches das interne <i>lon3</i> -Fragment enthält	diese Arbeit
pSUPHyg <i>lon4</i>	pSUPHyg mit 942 bp großem Fragment, welches das interne <i>lon4</i> -Fragment enthält	diese Arbeit
pSUPHyg <i>lon5</i>	pSUPHyg mit 948 bp großem Fragment, welches das interne <i>lon5</i> -Fragment enthält	diese Arbeit
pASK-IBA3 <i>lon2</i> -tag	pASK-IBA3 mit 2429 bp großem Fragment, welches das <i>lon2</i> -Gen ohne eigenes Stopcodon enthält	diese Arbeit
pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] <i>lon2</i> -tag	pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®] mit dem <i>lon2</i> -PCR-Fragment ohne Stopcodon von So ce56	diese Arbeit

Tabelle 2.3: *Escherichia coli* Stämme

Stämme	Beschreibung	Herkunft/Referenz
JM109	F'-Episom für filamentöse Phageninfektion; α -Komplementation; <i>lacI^q</i> ; <i>recA</i> ⁻ ; geeignet für M13 und pGEM; <i>e/4</i> ⁻ (<i>mcrA</i> ⁻); <i>recA1</i> ; <i>relA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi</i> ⁻ ; <i>hsdR17</i> (<i>r_k-mk</i> ⁻); <i>supE44</i> ; λ ⁻ ; Δ (<i>lac-proAB</i>)	Yanisch-Perron et al. (1985)
DH5 α	<i>supE44</i> ; Δ <i>lacU169</i> ; <i>hsdR17</i> ; <i>recA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi-relA</i>	Hanahan (1983)
Top 10	F ⁻ ; <i>mcrA</i> ; Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>); Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15; Δ <i>lacX74</i> ; <i>recA1</i> ; <i>deoR</i> ; <i>araD139</i> ; Δ (<i>ara-leu</i>)7697; <i>galU</i> ; <i>galK</i> ; <i>rpsL</i> ; (<i>Str^r</i>); <i>endA1</i> ; <i>nubG</i>	Invitrogen
BL21	F ⁻ ; <i>opmT</i> ; <i>hsdS_B</i> ; (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻); <i>gal</i> ; <i>dcm</i>	Invitrogen
ET12567	<i>dam13::Tn9</i> ; <i>dcm-6</i> ; <i>hsdM</i> ; <i>hsdR</i> ; <i>recF143</i> ; <i>zjj201::Tn10</i> ; <i>galK2</i> ; <i>galT22</i> ; <i>ara-14</i> ; <i>lacY1</i> ; <i>xyl-5</i> ; <i>leuB6</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>tonA31</i> ; <i>rpsL136</i> ; <i>hisG4</i> ; <i>tsx-78</i> ; <i>mtlI</i> ; <i>glnV44</i> ; F ⁻	MacNeil et al. (1992)
ET12456 pUB307	<i>dam13::Tn9</i> ; <i>dcm-6</i> ; <i>hsdM</i> ; <i>hsdR</i> ; <i>recF143</i> ; <i>zjj201::Tn10</i> ; <i>galK2</i> ; <i>galT22</i> ; <i>ara-14</i> ; <i>lacY1</i> ; <i>xyl-5</i> ; <i>leuB6</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>tonA31</i> ; <i>rpsL136</i> ; <i>hisG4</i> ; <i>tsx-78</i> ; <i>mtlI</i> ; <i>glnV44</i> ; F ⁻ ; RP1-Kan ^R ; Cm ^R	Bennett et al. (1977); Flett et al. (1997)
S17-1	<i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , RP4-2-Tc ::Mu-Km::Tn7	Simon et al. (1986)
Mach1 TM -T1 ^R	F ⁻ ; Φ 80(<i>lacZ</i>) Δ M15; Δ <i>lacX74</i> ; <i>hsdR</i> (<i>r_k-mk</i> ⁻); Δ <i>recA1398</i> ; <i>endA1</i> ; <i>tonA</i>	Invitrogen

Tabelle 2.4: *S. cellulosum* Stämme

Stämme	Beschreibung	Herkunft/Referenz
So ce56	Wildtyp; Kan ^R	Pradella et al. (2002)
Soce DSM 14627	Wildtyp; Kan ^R	DSZM
<i>SasgA</i>	<i>asgA</i> -Insertionsmutante; Kan ^R , Hyg ^R	diese Arbeit
<i>Slon1</i>	<i>lon1</i> -Insertionsmutante; Kan ^R , Hyg ^R	diese Arbeit
<i>Slon2</i>	<i>lon2</i> -Insertionsmutante; Kan ^R , Hyg ^R	diese Arbeit
<i>Slon3</i>	<i>lon3</i> -Insertionsmutante; Kan ^R , Hyg ^R	diese Arbeit
<i>Slon4</i>	<i>lon4</i> -Insertionsmutante; Kan ^R , Hyg ^R	diese Arbeit
<i>Slon5</i>	<i>lon5</i> -Insertionsmutante; Kan ^R , Hyg ^R	diese Arbeit
Soce: <i>relint</i> (<i>Srel</i>)	<i>rel</i> -Insertionsmutante; Kan ^R , Hyg ^R	Knauber (2006)

Tabelle 2.5: Weitere Stämme

Stämme	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>Micrococcus luteus</i>	Wildtyp	Wieser et al. (2002)
<i>Hansenula anomala</i>	Wildtyp	Gray (1949)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 MPphA	<i>pphA</i> ::Kan ^R	Irmeler & Forchhammer (2001)

2.2 Zellanzucht

2.2.1 Nährmedien

Nach der Herstellung des jeweiligen Mediums wird für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten werden dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar hinzugegeben. Für die Herstellung von Top-Agar werden dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 0,5 % (w/v) Agar hinzugegeben.

2.2.1.1 LB-Medium (Luria Bertani; (Sambrook et al. 1989))

10	g	Trypton	Pepton
5	g	Hefeextrakt	
10	g	Natriumchlorid	(171 mM)
ad 1000	ml	H ₂ O	

2.2.1.2 Minimalmedium für *E. coli* (Sambrook et al. 1989); modifiziert nach Maheswaran & Forchhammer (2003)

100	ml		10 x Phosphatlösung
1	ml	1 M	MgSO ₄
1	ml	0,1 M	CaCl ₂
1	ml	4 %	Thiamin
1	ml		Spurenelemente-Lösung
0,4	%		Glukose
0,2	%		Glutamin
ad 1000	ml		H ₂ O

10x Phosphatlösung:

60	g	Na ₂ PO ₄
30	g	KH ₂ PO ₄
5	g	NaCl
ad 1000	ml	H ₂ O

Vor dem Autoklavieren einen pH-Wert von 7,3 - 7,9 einstellen.

Spurenelemente-Lösung:

286	mg	H ₃ BO ₃ (Borsäure)
181	mg	MnCl ₂ (Mangan-II-Chlorid)
39	mg	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O (Natriummolybdatdihydrat)
22,2	mg	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
7,9	mg	CuSO ₄ · 5 H ₂ O
4,9	mg	Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O
ad 100	ml	H ₂ O

Lösung sterilfiltrieren.

2.2.1.3 M-Medium (Pradella et al. 2002)

1	%	Soja-Pepton
1	%	Maltose
0,1	%	CaCl ₂
0,1	%	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
50	mM	HEPES
8	mg/l	Fe-EDTA

Vor dem Autoklavieren einen pH-Wert von 7,2 einstellen.

2.2.1.4 M-Diff-Medium

0,01	%	Soja-Pepton
0,01	%	Maltose
0,1	%	CaCl ₂
0,1	%	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
50	mM	HEPES
8	mg/l	Fe-EDTA

Vor dem Autoklavieren einen pH-Wert von 7,2 einstellen.

2.2.1.5 P-Medium (Pradella et al. 2002)

0,1	%	Probion ¹
0,2	%	Pepton
0,5	%	Stärke
0,05	%	CaCl ₂
0,05	%	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
50	mM	HEPES

Vor dem Autoklavieren einen pH-Wert von 7,2 einstellen.

2.2.1.6 P-Diff-Medium

0,001	%	Probion
0,002	%	Pepton
0,005	%	Stärke
0,05	%	CaCl ₂
0,05	%	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
50	mM	HEPES

Vor dem Autoklavieren einen pH-Wert von 7,2 einstellen.

¹Einzellerprotein aus *Methylomonas clarae*

2.2.1.7 S-Medium (Müller & Gerth 2005)

0,5	%	Asparagin
0,05	%	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
100	mM	HEPES
10	mg/l	Fe-EDTA
0,05	%	CaCl ₂
0,006	%	K ₂ HPO ₄
1	%	C-Quelle

CaCl₂, K₂HPO₄ und die jeweilige C-Quelle werden erst nach dem Autoklavieren und Einstellen auf einen pH-Wert von 7,2 zugegeben.

C-Quellen:

SC	=	Cellobiose
SG	=	Glukose
SM	=	Maltose
SMA	=	Mannose

2.2.1.8 MYC-Medium (Kopp et al. 2004)

1	%	Pepton
1	%	Glukose
50	mM	HEPES

Vor dem Autoklavieren mit KOH einen pH-Wert von 7,0 einstellen.

2.2.1.9 Produktionsmedium (persönliche Mitteilung durch K. Gerth; modifiziert)

0,8	%	Stärke
0,2	%	Glukose
0,02	%	Probion
0,1	%	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
0,1	%	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
50	mM	HEPES
8	mg/l	Na-Fe-EDTA

Vor dem Autoklavieren mit KOH einen pH-Wert von 7,4 einstellen.

2.2.1.10 Medienzusätze

Nach dem Autoklavieren der Medien werden verschiedene Antibiotika zur Selektion auf plasmidkodierte Antibiotikaresistenzen eingesetzt. Die Zugabe dieser Substanzen erfolgt erst nach dem Abkühlen der Medien auf mindestens 50 °C. Die Lösungen werden nach dem Ansetzen sterilfiltriert und bei -20 °C aliquotiert aufbewahrt. Die Hygromycin-Lösung wird aufgrund ihrer

Lichtempfindlichkeit im Dunkeln verwahrt. Die Konzentrationen der Stammlösungen und die Arbeitskonzentrationen sind der Tabelle 2.6 zu entnehmen.

Tabelle 2.6: Medienzusätze

Substanz	Stammlösung	Arbeitskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Kanamycin, Serva	25 mg/ml in ddH ₂ O	50-100
Hygromycin B, Invitrogen	50 mg/ml in ddH ₂ O	100
Ampicillin, Roth	25 mg/ml in ddH ₂ O	50-100

2.2.2 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Zur Stammkonservierung werden während der logarithmischen Wachstumsphase je 0,9 ml Zellsuspension entnommen, mit 0,1 ml DMSO versetzt und bei -70 °C gelagert. DMSO wird als Gefrierschutzmittel eingesetzt. Es ist eine starke polare Verbindung, bindet somit Wasser und stabilisiert gleichzeitig die Makromoleküle. Dadurch wird in den Zellen der Wasserentzug, die Konzentrierung der Elektrolyte und die Bildung von Eiskristallen verhindert. Die Reinheit der Bakterienkulturen wird im Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse E200) überprüft.

2.2.3 Anzuchtbedingungen

2.2.3.1 Statische Kultur

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgt bei 37 °C aerob unter Schütteln bei ca. 180 rpm in LB-Medium. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, werden die jeweiligen Antibiotika in den üblichen Arbeitskonzentrationen zugesetzt. Zusätzlich zum Schütteln werden die Kulturgefäße nur mit bis zu 1/10 ihres Nennvolumens gefüllt, um eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten. Das Animpfen erfolgt mittels eines sterilen Zahnstochers, einer sterilen Impföse oder eines geeigneten Volumens einer flüssigen Vorkultur. Die Sterilität der Impföse und der Glaswaren wird durch das Abflammen mit Hilfe eines Bunsenbrenners gewährleistet.

Die Generationszeit der Bakterien liegt bei ca. 30 min. Eine Übernachtskultur besitzt eine Keimzahl von schätzungsweise $2 \cdot 10^9$ Zellen/ml.

Die verwendeten *S. cellulorum*-Stämme werden in M-Medium kultiviert. Als Kulturgefäße dienen Erlenmeyerkolben und Photometerkolben (Firma Ochs). Dabei wird ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:10 eingehalten, um eine optimale Sauerstoffzufuhr für die Zellen zu gewährleisten. Die Zugabe von Antibiotika und anderen Zusätzen erfolgt in den zuvor genannten Arbeitskonzentrationen. Die Flüssigkulturen werden bei 32 °C und ca. 180 rpm in einem Rotationsschüttler angezogen. Sie werden solange inkubiert, bis die für den Versuch nötige optische Dichte erreicht ist.

Ausgehend von einer Vorkultur mit M-Medium können die Stämme in anderen Medien, wie z. B. S-Medium oder M-Diff-Medium angezogen werden. Dies erfolgt durch einfaches Überimpfen einer kleinen Menge einer in M-Medium angezogenen Vorkultur in das jeweilige Medium.

2.2.3.2 Plattenkulturen

Für Plattenkulturen werden die Bakterien mit einer sterilen Impföse oder einem sterilen Zahnstocher auf einer LB-Agarplatte (*E. coli*) oder auf einer M-Agarplatte bzw. P-Agarplatte (*S. cellulorum*) mit dem jeweiligen Selektions-Antibiotikum ausgestrichen. Die LB-Agarplatten mit *E. coli* werden über Nacht bei 37 °C inkubiert, während die M-Agarplatten bzw. P-Agarplatten mit *S. cellulorum* für ca. 2-3 Tage bei 32 °C im Brutschrank inkubiert werden.

2.2.3.3 Messung der optischen Dichte

Die Trübungsmessung einer Bakteriensuspension dient der indirekten Bestimmung der Zellzahl. Diese Methode bedient sich des Effekts der Lichtstreuung an den in der Flüssigkultur enthaltenen Zellen. Die Zellzahl einer Bakteriensuspension kann mit dieser Methode indirekt ermittelt werden, da die optische Dichte (OD) bei einzelligen Organismen proportional zur Zellmasse ist.

Die Trübungsmessungen werden in 1-ml-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 600 nm mit einem Spektralphotometer (Ultraspec 3000pro, Pharmacia Biotech) gegen zellfreies Medium oder gegen ddH₂O durchgeführt. Die Proben werden abhängig von der Wachstumsphase direkt oder in geeigneten Verdünnungen gemessen, so dass der Messbereich zwischen 0 und 0,3 liegt. Für die Bestimmung der Zellzahl gilt:

Escherichia coli $OD_{600} = 1$ entspricht ca. $5 \cdot 10^8$ Zellen/ml

2.2.3.4 Messung des Klettwertes

Das Klett-Summerson-Colorimeter (Klett MFG Co., New York) dient der Zelltrübungsmessung wachsender Bakterienkulturen. Das Klettmeter besitzt spezielle Lichtfilter, die im Wellenlängenbereich von 380 nm bis 740 nm Licht transmittieren. In der vorliegenden Dissertation wird ein Rotfilter (KS-66) verwendet, der Licht im Wellenlängenbereich von 640-700 nm transmittiert. Die Skalabeschriftung ist direkt proportional zu der Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch die Verwendung von Photometerkolben bei der *S. cellulorum*-Kultivierung keine Probenentnahme zur Messung benötigt wird und somit eine Kontamination der Kultur vermieden werden kann.

2.2.3.5 Zellzahlbestimmung

Alle Zellzahlbestimmungen werden mit der Thoma-Zählkammer durchgeführt. Diese zeichnet sich durch eine Netzteilung in 16 Großquadrate aus, die sich aus jeweils 16 Kleinquadraten mit einer Seitenlänge von 0,05 mm zusammensetzen. Der Abstand zwischen Deckglas und Objektträger beträgt 0,1 mm und somit ergibt sich folgendes Volumen über einem Kleinquadrat:

Länge Kleinquadrat = 0,05 mm

Tiefe = 0,1 mm

Volumen über einem Kleinquadrat = 0,00025 mm³

Um auf die übliche Bezugsgröße von 1 ml (= 1 cm³) zu kommen, muss das Volumen von 0,00025 mm³ mit dem sogenannten Kammerfaktor von $4 \cdot 10^6$ multipliziert werden. Daher gilt für die Bestimmung der Zellzahl folgendes:

Durchschnittliche Zahl der Mikroorganismen pro Kleinquadrat $\cdot 4 \cdot 10^6 = \text{Zellzahl/ml}$

2.2.3.6 Erstellung einer Wachstumskurve von *S. cellulorum*- Bakterienkulturen

Um das Wachstum von verschiedenen *S. cellulorum*-Bakterienkulturen zu verfolgen, werden die Kulturen zunächst mit einer optischen Dichte von 0,2 bei 600 nm bzw. einem Klettwert von 40 angeimpft. Die Kulturen werden bei 32 °C unter Schütteln bei ca. 180 rpm inkubiert. Das Wachstum der Kulturen wird durch Messung der optischen Dichte bzw. des Klettwertes verfolgt. Zur grafischen Darstellung der Wachstumskurve wird in halblogarithmischer Skalierung die optische Dichte bei 600 nm bzw. die Klettwerte gegen die Zeit in Stunden aufgetragen.

2.2.3.7 Bestimmung der Verdopplungszeit t_d einer *S. cellulorum*- Bakterienkultur

Um die Verdopplungszeit t_d einer Bakterienkultur von *S. cellulorum* zu ermitteln, werden von dieser zu bestimmten Zeitpunkten die Klettwerte bestimmt. Die Wachstumsrate μ wird ermittelt, indem die Datenpunkte der exponentiellen Phase halblogarithmisch zur Basis 2 (siehe Gleichungen (2.1) und (2.2)) dargestellt und mit einem linearen Fit die Steigung der hierbei entstehenden Geraden ermittelt werden. Der Reziprokwert der Steigung ergibt direkt die Verdopplungszeit t_d .

$$\log_2(\text{Klett}) = \mu \cdot t + \log_2(\text{Klett}_{\text{Start}}) \quad (2.1)$$

$$t_d = \frac{1}{\mu} \quad (2.2)$$

2.2.4 Methoden zur Charakterisierung des Phänotyps

2.2.4.1 Differenzierungsassay von *S. cellulorum*

Um *S. cellulorum* So ce56 und vor allem Mutanten von *S. cellulorum* hinsichtlich der morphologischen Differenzierung zu charakterisieren, werden die Stämme zunächst in M-Medium angezogen bis sie eine OD₆₀₀ von 4 (ca. $1,5 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml) erreicht haben. Jeweils 7 ml werden pro Kultur abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, RT) und das Zellsediment wird einmal in M-Medium gewaschen, um etwaige Stoffwechselprodukte zu entfernen. Nach dem Waschschrift werden die Zellen wiederum in M-Medium aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 25 (ca. $6,5 \cdot 10^{11}$ Zellen/ml) konzentriert. Von diesen konzentrierten Zellsuspensionen werden jeweils 50 µl auf 3 ml P-Diff-Agar aufgetropft.

Der Differenzierungsassay wird in 12-*well* Mikrotiterplatten durchgeführt, die pro *well* 3 ml P-Diff-Agar enthalten. Nach dem Eintrocknen der aufgetropften Zellsuspension werden die Platten bei 32 °C für mehrere Tage inkubiert.

2.2.4.2 Qualitativer Nachweis der Produktion von Sekundärmetaboliten mittels Bioassay

Für den qualitativen Nachweis von Sekundärmetaboliten bedient man sich des sogenannten Bioassays. Dabei werden Indikatororganismen eingesetzt, welche sensitiv auf bestimmte Sekundärmetabolite reagieren. Im Fall von *S. cellulorum* sind das die beiden Indikatororganismen *Hansenula anomala* und *Micrococcus luteus*. Die Hefe *H. anomala* dient dabei als Indikatororganismus für Chivosazol A, wohingegen *M. luteus* sensitiv auf die Produktion von Etnangien reagiert.

Für den Bioassay werden die Stämme von *S. cellulorum* zunächst in M-Medium bis Erreichen der exponentiellen Phase angezogen. Anschließend werden die Kulturen in 10 ml Produktionsmedium (siehe 2.2.1.9 unter Zugabe von 2% XAD-16 (Müller & Gerth 2005) auf eine OD₆₀₀ von 0,5 angeimpft. Das XAD-16 dient dabei in erster Linie zur Bindung der produzierten Sekundärmetabolite, des Weiteren regt XAD-16 aber auch die Produktion derer an. Die Kulturen werden nun für 14 Tage bei 32 °C und 180 rpm in einem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wird das XAD-16 mittels eines Filters von der restlichen Kultur getrennt, kurz an der Luft getrocknet und in 1 ml Methanol gegeben. Das Methanol löst nun die gebundenen Sekundärmetabolite aus dem XAD-16. Für die Extraktion der Sekundärmetabolite verbleibt das XAD-16 für eine Stunde bei RT unter Rotation auf einem Schüttler im Methanol. Für den Bioassay werden dann 500 µl der in Methanol extrahierten Sekundärmetabolite auf 1/10 des Volumens in der Vakuumzentrifuge eingeengt.

Für die Durchführung des Bioassays wird *M. luteus* über Nacht in 10 ml LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 32 °C inkubiert, während *H. anomala* unter gleichen Bedingungen in MYC-Medium angezogen wird. Jeweils 400 µl der beiden Kulturen werden mit 4 ml des jeweiligen Top-Agars vermischt und auf die dazugehörige Platte gegossen. Dabei ist darauf zu achten, dass der Top-Agar nicht mehr allzu heiß ist, damit die Organismen nicht absterben.

Nach dem Verfestigen des Top-Agars werden 3 µl (*M. luteus*) bzw. 1 µl (*H. anomala*) der Sekundärmetabolitlösung auf kleine Stücke Whatman-Papier (Durchmesser 0,6 mm) pipettiert und dieses vorsichtig auf dem Top-Agar abgelegt. Die Platten werden anschließend bei 32 °C über Nacht inkubiert. Die aufgebrachte Lösung mit Sekundärmetaboliten diffundiert in die Umgebung, wo sie in Abhängigkeit der Konzentration an Sekundärmetaboliten Hemmhöfe entstehen lässt. Damit lässt sich eine semiquantitative Aussage über die Bildung der Sekundärmetabolite des jeweiligen *S. cellulorum*-Stammes machen.

2.3 Transformation

Transformation ist die Bezeichnung für einen Mechanismus der DNA-Übertragung bei Mikroorganismen, bei dem natürlich (im Zustand der so genannten Kompetenz) oder induziert, nackte DNA in die Zelle aufgenommen wird. Man unterscheidet verschiedene physikalische und chemi-

sche Methoden der Transformation für *E. coli*. Bei der Elektroporation oder auch Elektrotransformation handelt es sich um eine physikalische Methode der Transformation. Für die Elektroporation werden salzfreie Zellen benötigt, da ein Anlegen von elektrischer Spannung zum Kurzschluss führen kann. Zur chemischen Methode der Transformation zählt man die Hitzeschock-Transformation oder RbCl-Transformation. Für diese Methode benötigt man CaCl₂- oder RbCl-kompetente Zellen, die einen hohen Salzgehalt haben.

2.3.1 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

2.3.1.1 Herstellung von elektro-kompetenten *E. coli*- Zellen

Zur Herstellung der elektro-kompetenten Zellen werden die verschiedenen *E. coli*-Stämme in LB-Medium angezogen. Dafür werden 50 ml LB-Medium mit je einer Bakterienkolonie der verschiedenen *E. coli*-Stämme von einer frisch angelegten Plattenkultur steril angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Am darauf folgenden Tag werden 500 ml LB-Medium mit der jeweiligen Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ von 0,5 bis max. 0,8 bei 37 °C geschüttelt. Alle nachfolgenden Schritte erfolgen auf Eis bzw. bei 4 °C. Die Kulturen werden zunächst für 10-20 min auf Eis abgekühlt, die Zellen werden abzentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Zellsediment wird nacheinander zweimal in 1 Vol. eiskaltem sterilen Wasser und zweimal in je 30 ml eiskaltem 10 %igem (w/v) Glycerin gewaschen. Dadurch wird der Salzgehalt der Zellen drastisch reduziert. Die Zellen lassen sich nun zunehmend schlechter sedimentieren, weshalb die Zentrifugationen nach den einzelnen Waschschritten mit stetig steigenden g-Zahlen durchgeführt werden. Zwischen den einzelnen Waschschritten werden die Zellen immer wieder gründlich resuspendiert. Abschließend werden die Zellen in 0,5-0,75 ml 10 %igem (w/v) Glycerin aufgenommen, in 40 µl-Volumina aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Die Zelldichte beträgt nun ca. $1-3 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml.

2.3.1.2 Elektroporation von elektro-kompetenten *E. coli*- Zellen

Diese physikalische Methode ermöglicht die effiziente und schnelle Transformation von Bakterienzellen (Shigekawa & Dower 1988). Dabei wird die Membran durch ein kurzzeitig angelegtes Feld mit hoher Spannung durchlässig. Die durchlässige Membran kann von Makromolekülen passiert werden, was zur Einschleusung von Fremd-DNA bzw. rekombinanter DNA in die Zellen genutzt werden kann (Dower et al. 1988).

Die Elektroporation erfolgt in einem Elektroporations-Pulser (BioRad Laboratories GmbH, München). Pro Reaktion werden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-3 µl DNA-Lösung (20 bis 500 ng in H₂O oder TE-Puffer) versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm überführt. Die Elektroporation erfolgt bei 1,8 kV für ca. 5 ms. Nach dem Strompuls werden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Regeneration für 1 h bei 37 °C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Anschließend können die Zellen auf den entsprechenden Selektivagarplatten ausplattiert werden.

2.3.1.3 Herstellung von kompetenten *E. coli*- Zellen zur Hitzeschock-Transformation

Für diese Methode wird das Verfahren nach dem Handbuch „*The QIAexpressionist*“ angewendet. Zur Herstellung der Hitzeschock-kompetenten *E. coli*-Zellen wird zunächst von frisch angelegten Plattenkulturen der verschiedenen *E. coli*-Stämme je eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 10 ml LB-Medium (ggf. mit Antibiotikum) überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Von dieser Übernachtskultur impft man 100 ml vorgewärmtes LB-Medium mit dem jeweiligen Selektions-Antibiotikum in einem 250 ml Kolben 1 %ig an und zieht die Kultur bis Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis maximal 0,8 bei 37 °C unter Schütteln an. Nach Erreichen dieser OD₆₀₀ werden die Kulturen für 5 min auf Eis abgekühlt. Alle nachfolgenden Schritte finden auf Eis bzw. bei 4 °C statt. Nachdem die Kulturen unter sterilen Bedingungen in Zentrifugenbecher überführt wurden, werden die Zellen für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird vorsichtig dekantiert.

Das Zellsediment wird in 30 ml kaltem TFB 1-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Danach wird die Zellsuspension erneut für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand restlos dekantiert. Das Zellpellet wird in 4 ml eiskaltem TFB 2-Puffer resuspendiert. Je 200 µl-Volumina werden von dieser Lösung aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

TFB 1-Puffer:	100	mM	RbCl
	50	mM	MnCl ₂
	30	mM	Kaliumacetat
	10	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin

TFB 1-Puffer auf einen pH-Wert von 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

TFB 2-Puffer:	10	mM	MOPS
	10	mM	RbCl
	75	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin

TFB 2-Puffer mit K-OH auf einen pH-Wert von 8,0 einstellen und sterilfiltrieren.

2.3.1.4 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*- Zellen

Bei der Hitzeschock-Transformation werden 200 µl der kompetenten Zellen mit 1-4 µl (20-500 ng) der zu transformierenden DNA versetzt, gut gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Dabei lagert sich die DNA an die Membran der kompetenten Zellen an. Dann erfolgt der Hitzeschock, indem die Zellen für 90 sec bei 42 °C inkubiert werden. Nach 2 min Inkubation auf Eis erfolgt die Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum. Der Ansatz wird zur Regeneration für 60 min bei 37 °C inkubiert. Hierbei hängt die Zeitspanne der Regeneration von der aufgenommenen Resistenz ab. Abschließend werden die Zellen auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

2.3.2 Konjugation von Plasmiden nach *S. cellulorum*

Da *S. cellulorum* schwer bis gar nicht transformierbar ist, müssen Plasmide aus *E. coli* mittels di- oder triparentaler Konjugation in *S. cellulorum* transferiert werden. Unter Konjugation versteht man hierbei den durch Plasmide vermittelten Transfer von genetischem Material von einem Donor in einen Rezipienten via Zellkontakt. Für eine erfolgreiche Konjugation sind zwei Gruppen von plasmidkodierten Genen zuständig, die sogenannten *tra*-Gene (Transfer) und die *mob*-Gene (Mobilisierung). Die *tra*-Gene sind dabei unter anderem für die Synthese der sogenannten „Pili“ zuständig, über den der Austausch des genetischen Materials erfolgt. Die *mob*-Region hingegen kodiert unter anderem für ein Mobilisierungsprotein, welches den für den Transfer notwendigen Einzelstrangbruch des Plasmids vermittelt.

Für die Konjugation von Plasmiden nach So ce56 wurde im Rahmen dieser Dissertation auf folgende zwei Konjugationsansätze zurückgegriffen:

- Biparentale Konjugation
E. coli ET12567 pUB307 (*tra*⁺; *mob*⁺) mit entsprechendem Plasmid (*tra*⁻; *mob*⁺) + *S. cellulorum*
- Biparentale Konjugation
E. coli S17-1 (*tra*⁺; *mob*⁺) mit entsprechendem Plasmid (*tra*⁻; *mob*⁺) + *S. cellulorum*

Als Vorbereitung für die Konjugation nach *S. cellulorum* wird zunächst So ce56 frisch von Platte in 10 ml M-Medium kultiviert und bis Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 4-5 unter Schütteln inkubiert. Die für die Konjugation notwendigen *E. coli* Stämme werden über Nacht in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Am darauffolgenden Tag werden die Stämme auf eine OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 für die Konjugation verwendet.

Für die Konjugation werden zunächst 200 µl des *E. coli*-Stammes (Donor) durch einen zweiminütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm sedimentiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, werden 600 µl der Kultur von So ce56 (Rezipient) hinzugegeben. Es erfolgt wiederum ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 5 min. Der Zellmix wird in 500 µl M-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert und steril auf eine P-Agar-Platte ohne Antibiotikum getropft. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37 °C werden die Zellen von der Agarplatte abgekratzt und in 500 µl M-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert. 100 und 200 µl der Zellsuspension werden auf P-Agarplatten mit dem Selektions-Antibiotikum ausplattiert. Nach ca. 10 Tagen bilden sich orangefarbene Kolonien, die gepickt und auf einer M-Agarplatte mit Selektions-Antibiotikum ausgestrichen werden.

2.3.2.1 Der Konjugationsvektor pSUPHyg

Für die Konjugation nach *S. cellulorum* wurde der Vektor pSUPHyg (Abb. 2.1) genutzt. Der Vektor besitzt neben einem *oriT* eine *mob*-Region, welche für die Konjugation notwendig ist. Da

der Vektor allerdings keine *tra*-Region aufweist, muss diese durch Helferplasmide oder geeignete *E. coli*-Stämme in den Konjugationsansatz eingebracht werden (siehe 2.3.2). Der Konjugationsvektor pSUPHyg vermittelt eine Hygromycin- sowie eine Tetrazyklin-Resistenz.

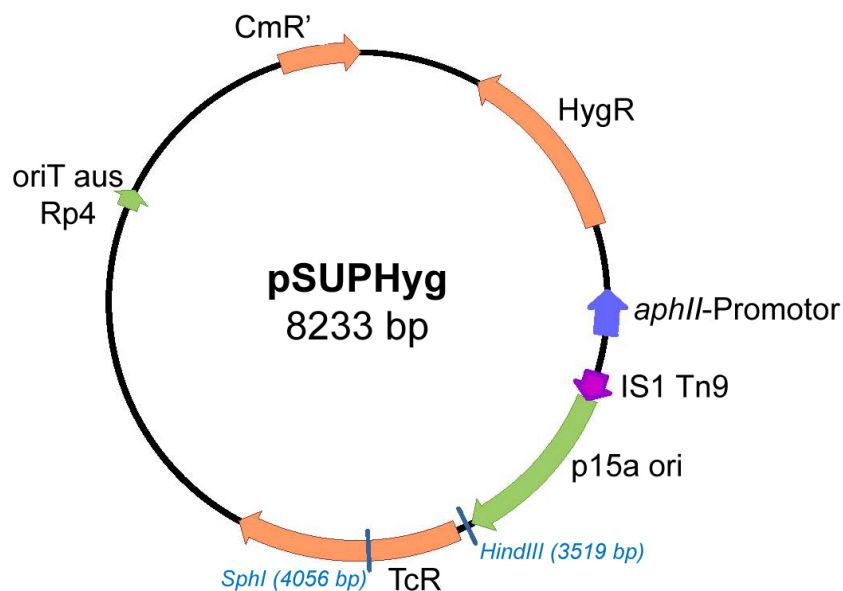


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Konjugationsvektors pSUPHyg. Gezeigt sind die Lage der verschiedenen (Resistenz-) Gene und die Erkennungssequenzen zweier für weitere Klonierungen wichtige Restriktionsendonukleasen. Die Graphik wurde mittels der Software Vector NTI generiert. TcR = Tetrazyklinresistenzgen; HygR = Hygromycinresistenzgen unter der Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes; CmR' = zerstörtes Chloramphenicolresistenzgen.

2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen werden bei 121 °C für 20 min autoklaviert, um Nukleasen zu inaktivieren. Nicht hitzestabile Geräte werden mit 70 %igem (v/v) Ethanol gespült und hitzelabile Lösungen werden sterilfiltriert.

2.4.2 Plasmid-Isolierung

Für die Isolierung von Plasmiden werden die Zellen durch Lyse in Gegenwart von SDS (Natriumdodecylsulfat) bei alkalischem pH-Wert aufgeschlossen (Birnboim & Doly 1979). Das eingesetzte SDS denaturiert zelluläre Proteine sowie chromosomale und Plasmid-DNA. Nach Neutralisation durch Kaliumacetat fallen Lipide, Proteine und chromosomale DNA als unlöslicher Komplex aus. Plasmid-DNA wird renaturiert und lässt sich somit von der chromosomalen DNA trennen. Durch

Ethanolpräzipitation kann die Plasmid-DNA direkt aus dem Überstand der folgenden Zentrifugation gewonnen werden. Plasmide unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl von Kopien, mit der sie in der Zelle vorliegen. Abhängig von dem jeweiligen *origin of replication* unterscheidet man zwischen *high copy*-Plasmiden mit 300 bis 1000 Kopien pro Zelle, *low copy*-Plasmiden, die mit weniger als 200 Kopien in der Zelle vorliegen und *very low copy*-Plasmiden, deren Kopienzahl weniger als 10 pro Zelle beträgt.

2.4.2.1 Plasmid-Minipräparation

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* werden 2 x 1,5 ml Zellen einer 5 ml Übernachtskultur für 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl kaltem Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer 2 wird der Ansatz vorsichtig bis zur Lyse der Zellen geschwenkt. Das Lysat wird mit 150 µl eiskaltem Puffer 3 versetzt und durch Schütteln vermischt (max. 5 min). Es bildet sich ein weißer Niederschlag (Proteinpräzipitat + chrom. DNA), der durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min sedimentiert wird. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und falls notwendig erneut für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um allen Niederschlag zu entfernen. Der Überstand wird mit 3 M Na-Acetat (pH 5,2) auf 0,3 M Na-Acetat eingestellt. Zusätzlich werden 2,5 Vol. eiskaltes 96 %iges Ethanol für die Fällung zugefügt. Der Ansatz wird in flüssigem Stickstoff kurz schockgefroren oder für 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C wird gefällte Plasmid-DNA mit 100 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend für 3 bis 5 min bei Raumtemperatur in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und danach in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen.

Puffer 1: 50 mM Glucose
25 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA

Nach dem Autoklavieren Lagerung bei 4 °C. Vor dem Gebrauch, Zugabe von 100 µg/ml RNase.

Puffer 2: 2,0 N NaOH
1 % SDS

Puffer 2 wird aus einer 10 N NaOH Stammlösung und einer Stammlösung von 20 % SDS frisch hergestellt.

Puffer 3: 60 ml Kalium-Acetat (3 M)
11,5 ml Eisessig
ad 100 ml ddH₂O

Puffer 3 wird nicht autoklaviert; Lagerung bei 4 °C.

2.4.2.2 Plasmid-Minipräparation nach Peglab

Für die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wird der E.Z.N.A.[®] Plasmid Kit II der Firma Peqlab verwendet. Die Durchführung der Plasmid-Präparation erfolgt nach dem Protokoll für die Reinigung von Plasmid-DNA mit den in dem Kit enthaltenen Säulen und Puffern. Er ermöglicht die Isolierung von bis zu 75 µg qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA aus einer 15 ml LB-Übernachtskultur. Der E.Z.N.A.[®] Plasmid Kit II kombiniert eine modifizierte alkalische Lyse mit den selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaften von HiBind[®]-Silikamembranen sowie der Schnelligkeit und leichten Durchführbarkeit von Zentrifugationssäulen.

2.4.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cellulorum*

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cellulosum* werden 2 x 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 567 μ l TE-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 30 μ l 10 %iger SDS-Lösung und 3 μ l Proteinkinase K (20 mg/ml) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit 100 μ l 5 M NaCl vermischt, mit 80 μ l CTAB-Lösung versetzt und für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Es folgt die Zugabe von 180 μ l Chloroform/Isoamylalkohol und eine Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 180 μ l Phenol/Chloroform versetzt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 13.000 rpm wird der Überstand erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol und mehrmaligem Schütteln präzipitiert. Die gefällte DNA wird entweder vorsichtig mit einer Pipettenspitze entnommen oder nach einer Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm als Pellet weiterbehandelt.

Das Pellet bzw. die DNA wird mit 100 μ l 70 %igem Ethanol gewaschen und kurz in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrocknete DNA wird in 10-50 μ l TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer: 1 mM EDTA
 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Nach dem Autoklavieren Lagerung bei Raumtemperatur.

CTAB-Lösung:	2,05	g	NaCl
	5	g	Cetyltrimethylammoniumbromid (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)
	ad 50	ml	ddH ₂ O

Auf 65 °C erhitzen und anschließend Lagerung bei Raumtemperatur.

2.4.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. cellulorum*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA (Gabain et al. 1983) aus *S. cellulorum* werden je 15 ml Kultur für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 250 µl RNA-Puffer I resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl RNA-Puffer II und Vortexen der Probe, erfolgt der Zellaufschluss durch Inkubation für 90 sec bei 65 °C. Um Proteine zu entfernen, werden nun 500 µl auf 65 °C vorgewärmtes Phenol-H₂O hinzugegeben, der Ansatz gemischt, gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation bei 65 °C. Im Anschluss daran wird der Ansatz für mindestens 30 sec in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach einem 10minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und Raumtemperatur wird die obere wässrige Phase abgenommen und in neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Extraktion mit vorgewärmten Phenol-H₂O wird noch zwei weitere Male wiederholt. Anschließend wird der Ansatz mit 80 µl 3 M Natriumacetat pH 4,5 versetzt und gemischt. Durch eine Ethanol-fällung werden die Nukleinsäuren präzipitiert. Die Fällung der RNA findet vorzugsweise bei -80 °C für 40 min statt. Nach der Präzipitation wird die RNA durch einen 20minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4 °C geerntet. Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrocknete RNA wird in 180 µl RNA-storage-Puffer aufgenommen.

Zur vollständigen Entfernung von DNA werden 20 µl 10x DNase-Puffer und 2 µl DNase I (1U/µl) hinzugegeben und der Ansatz wird für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.4.5.1) wird die RNA in 50 µl RNase-freiem ddH₂O oder RNA-storage-Puffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Die aufgelisteten Puffer werden mit DEPC-H₂O (1 ml DEPC pro l) angesetzt.

RNA-Puffer I: 0,3 M Saccharose
 10 mM Natriumacetat, pH 4,5

Nach dem Autoklavieren Lagerung bei Raumtemperatur.

RNA-Puffer II: 2 % SDS
 10 mM Natriumacetat, pH 4,5

Nach dem Autoklavieren Lagerung bei Raumtemperatur.

RNA-storage-Puffer: 20 mM Natriumphosphat, pH 6,5
 1 mM EDTA

Nach dem Autoklavieren Lagerung bei Raumtemperatur.

2.4.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.4.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient zur Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäure-Lösungen. Dabei werden die Proteine denaturiert und verworfen, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben.

Für die Phenol-Chloroform-Extraktion wird die zu reinigende Nukleinsäure-Lösung mit max. 1 Vol. Phenol-Chloroform versetzt, gut gemischt und zur Phasentrennung 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Zentrifugation führt zur Phasentrennung in eine untere organische Phenolphase, eine Interphase, die das denaturierte Protein enthält und eine wässrige Phase. Die obere wässrige Phase kann nun vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden. Sollte die Nukleinsäure-Lösung anschließend einer Ethanolpräzipitation (siehe 2.4.5.2) unterzogen werden, so wird bereits vor Zugabe von Phenol-Chloroform die Ionenkonzentration auf 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) eingestellt, da dadurch die Denaturierung von Proteinen erleichtert wird (Wallace 1987). Dies empfiehlt sich beispielsweise für einen Ligationsansatz vor einer Elektrottransformation, da hierbei hohe Salzkonzentrationen zu einem Kurzschluss führen können.

2.4.5.2 Ethanolpräzipitation

Die Konzentrierung von Nukleinsäuren und das Entfernen von Salzen sowie Phenol- und Chloroformresten, welche überwiegend in Lösung bleiben, erfolgt durch Präzipitation (Fällung) mit Ethanol in Gegenwart monovalenter Kationen. Zur Präzipitation können jedoch auch andere Alkohole verwendet werden. Durch Zugabe von Salz und Ethanol werden die Nukleinsäuren gefällt, indem ihre Löslichkeit durch Absättigung der negativ geladenen Phosphatgruppen herabgesetzt wird. Die Nukleinsäuren fallen aus, während niedermolekulare Moleküle wie Oligonukleotide gelöst bleiben.

Nukleinsäure-Lösungen werden mit 3 M Na-Acetat (pH 5,2) auf 0,3 M Na-Acetat eingestellt. Nach Zugabe von 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (96 %, v/v) wird der Ansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder bei -20 °C für mind. 30 min inkubiert. Die gefällte DNA wird für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet wird mit eiskaltem Ethanol (70 %, v/v) gewaschen, um mitgefällte Salze zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Pellet für 1-2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wird es in einem adäquaten Volumen TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) gelöst.

2.4.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA und RNA absorbieren ultraviolettes Licht mit einer Maximalabsorption bei ca. 260 nm aufgrund der π -Elektronensysteme der konjugierten Doppelbindungen in den Basen von Nukleinsäuren. Mit Hilfe der UV-Absorptionsspektroskopie kann die Konzentration einer Nukleinsäure bestimmt und deren Reinheit näherungsweise ermittelt werden. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm kann als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen werden. Für

DNA werden Werte von 1,8 bis 1,9 toleriert, für RNA-Lösungen Werte von ungefähr 2,0. Hohe Absorptionen bei 280 nm deuten auf Protein- oder Phenolverunreinigungen hin. Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure erfolgt photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich dabei aus der Absorption bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor.

Für eine Absorption von 1 wird von folgenden Konzentrationen ausgegangen:

doppelsträngige DNA	$1A_{260}$	= 50 $\mu\text{g/ml}$
einzelsträngige DNA	$1A_{260}$	= 30 $\mu\text{g/ml}$
RNA	$1A_{260}$	= 40 $\mu\text{g/ml}$
Oligonukleotide	$1A_{260}$	= 31 $\mu\text{g/ml}$
(A ₂₆₀ = Absorption bei 260 nm)		

2.4.7 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wird standardmäßig bei der Restriktionsanalyse von Plasmiden, für die Analyse isolierter Plasmid-DNA und zur Analyse von PCR-Produkten oder Transkriptionsprodukten eingesetzt.

Zur Herstellung von Agarosegelen wird zunächst die benötigte Menge an Agarose eingewogen und mit 1x TBE-Puffer auf das gewünschte Endvolumen gebracht. Dieses wird dann aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Die Konzentration an Agarose beträgt in der Regel 1 % (w/v). Die flüssige Agarose wird anschließend in einen abgedichteten rechteckigen Flachbettschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren wird das Agarosegel mit Schlitten in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die aufzutrennenden Proben werden mit 5x DNA-Auftragspuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard werden 200-300 ng 1 kb-Größenmarker (GeneRulerTM 1kb DNA ladder, ready-to-use von MBI, Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von ca. 50 mA. Zum Nachweis der DNA bzw. Nukleinsäuren in Gelen verwendet man Ethidiumbromid (1 $\mu\text{g/ml}$ H₂O). Dieses enthält eine planare aromatische Gruppe, die in die gestapelten Basen der Nukleinsäuren interkaliert. Die gefärbten Gele werden dann unter langwelligem UV-Licht betrachtet und fotografiert.

5x DNA-Auftragspuffer:	4	M	Harnstoff
	5	%	Saccharose (w/v)
	50	mM	EDTA
	0,1	%	Bromphenolblau (w/v)
	0,1	%	Xylencyanol (w/v)

Der pH-Wert des DNA-Auftragspuffers sollte bei pH 7,0 liegen.

10x TBE-Puffer:	890	mM	Tris-HCl
	890	mM	Borat
	25	mM	EDTA
	ad 1000	ml	H ₂ O

Der pH-Wert des 10x TBE-Puffers sollte bei pH 8,3 liegen.

2.4.7.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten, beispielsweise nach einer PCR oder einer Restriktion, werden diese zunächst auf einem Agarosegel präparativ aufgetrennt. Nach der Auftrennung kann das spezifische DNA-Fragment mit Hilfe des *QIAquick Gel-Extraction Kits* der Firma Qiagen isoliert werden. Die im Reagenziensatz enthaltenen Puffer und Säulen werden dabei nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip der Isolierung bzw. Reinigung beruht auf der irreversiblen Verflüssigung der Agarose und der Bindung der DNA an eine Silika-Gel-Membran unter Verwendung von spezifischen Puffer- und pH-Bedingungen. Dem liegt zugrunde, dass in Gegenwart eines chaotropen Salzes, Nukleinsäuren spezifisch an Silikaoberflächen binden. Die Durchführung erfolgt nach dem, dem *QIAquick Gel-Extraction Kit* beiliegenden Protokoll.

2.5 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

2.5.1 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen der Klasse II erkennen palindromische Sequenzen von meist 4-6 Basen, innerhalb derer sie in Gegenwart von Magnesiumionen eine hydrolytische Spaltung der DNA katalysieren. Dabei können glatte oder 5'- bzw. 3'-überhängende DNA-Enden entstehen.

Die Restriktion von Plasmid-DNA wird gemäß den Standardvorschriften (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Dabei werden die Reaktionsbedingungen und Enzympuffer entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gewählt. Die Restriktion der DNA erfolgt in einem Gesamtvolumen von mind. 10 µl/µg DNA bei der empfohlenen Temperatur für 1-12 Stunden. Der Enzymanteil im Ansatz sollte 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Restriktionsendonukleasen in glycerinhaltigen Puffern aufbewahrt werden und zu hohe Glycerinkonzentrationen (< 5 %) den Reaktionsverlauf negativ beeinflussen.

Das Ergebnis einer Restriktion wird mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Für viele Zwecke kann ein Restriktionsansatz direkt ohne Aufreinigung für Folgereaktionen eingesetzt werden. In einigen Fällen ist es jedoch nötig, das Restriktionsenzym durch Hitzedenaturierung zu inaktivieren oder mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (2.4.5.1) zu entfernen. Zum Entfernen von Puffersalzen ist meistens eine Ethanolpräzipitation (2.4.5.2) ausreichend.

2.5.2 Dephosphorylierung von DNA

Um in Ligationsansätzen die Religation der linearisierten Vektoren zu verhindern und somit die Effizienz der Klonierung zu erhöhen, werden diese am 5'-Ende durch Einsatz der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert (Seeburg et al. 1977). Die alkalische Phosphatase katalysiert die Freisetzung von terminalen 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA, Ribo- und Desoxyribonukleosid-Triphosphaten.

Für die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wird vorwiegend die alkalische Phosphatase aus dem Kälber Intestinum (CIAP = *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) verwendet. Die Behandlung und Durchführung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers (MBI, Fermentas).

Die Reaktion wird mit linearisiertem Vektor (in einem 50 µl Ansatz) wie folgt durchgeführt:

Dephosphorylierungsansatz

1-20	pmol	DNA in 10-40 µl Lösung
5	µl	10x Reaktionspuffer
0,05	U/pmol DNA	CIAP (1 U/µl)
ad 50	µl	ddH ₂ O

Die Reaktion wird für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Phosphatase wird anschließend bei 85 °C für 15 min oder durch Phenol-Chloroform-Extraktion (2.4.5.1) inaktiviert. Die DNA wird durch eine anschließende Ethanolpräzipitation (2.4.5.2) aufgereinigt.

Die Anzahl an pmol zu dephosphorylierenden Enden berechnet sich nach der Formel:

$$\frac{\text{pmol Enden}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{2 \cdot 10^6}{\text{Anzahl an Basenpaaren} \cdot 660}$$

2.5.3 Herstellung von *blunt-end*- Fragmenten

Für die Herstellung ligierbarer Enden ist es z. T. notwendig, die von unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen gebildeten nicht kompatiblen 3'- oder 5'-Enden der verdauten DNA mit Hilfe des Klenow-Fragmentes zu entfernen (Sambrook et al. 1989). Das Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I besitzt die DNA-Polymerase-Aktivität sowie die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, wohingegen die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität fehlt. Mit dem Klenow-Fragment können deshalb überstehende 5'-Enden mit Nukleotiden aufgefüllt werden oder die 3'-überstehenden Enden abgedaut werden. Die so gebildeten *blunt-ends* (glatte DNA-Enden) können dann ligiert werden. Die Durchführung der Herstellung der *blunt-ends* erfolgt nach den Angaben der Hersteller (MBI, Fermentas). Ein Ansatz dieser Reaktion setzt sich wie folgt zusammen:

Ansatz für die Herstellung von *blunt*- Enden (MBI, Fermentas)

10 – 15	μl	verdaute DNA (0,1-4 μg)
2	μl	10x Klenow-Puffer
0,5	μl	2 mM dNTP's
1 – 5	U	Klenow-Fragment
ad 20	μl	ddH ₂ O

Für 10 min bei 37 °C inkubieren.

Hitzeinaktivierung für 10 min bei 75 °C.

2.5.4 Ligation von DNA

Die Ligation entspricht formal der Reparatur zweier Einzelstrangbrüche einer doppelsträngigen DNA durch Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Enden durch die T4-DNA-Ligase. Die T4-DNA-Ligase kann unter Hydrolyse von ATP als Cofaktor sowohl überhängende als auch glatte DNA-Enden verbinden. Die Durchführung der Ligation erfolgt nach den Angaben des Herstellers (MBI, Fermentas). Ein Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Ligationsansatz

50-400	ng	Vektor-DNA
x	ng	<i>insert</i> -DNA (pmol Enden; siehe Formel)
2	μl	10x T4-Ligase-Puffer (enthält ATP)
2	U (<i>sticky ends</i>)	T4-DNA-Ligase
4	U (<i>blunt ends</i>)	
ad 20	μl	ddH ₂ O

Bei Ligationen von *blunt*-Enden wird zusätzlich PEG 4000 hinzugegeben. Es wird in gleicher Menge wie der 10x Ligase-Puffer eingesetzt. Die Ligation wird mindestens im Verhältnis 2:1 von *insert* und Vektor angesetzt und nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{pmol Enden}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{2 \cdot 10^6}{\text{Anzahl an Basenpaaren} \cdot 660}$$

Die Ligation wird über Nacht bei Raumtemperatur (*blunt ends* = glatte DNA-Enden) oder 16 °C (*sticky ends* = überhängende DNA-Enden) inkubiert. Die T4-DNA-Ligase wird durch 15minütige Inkubation bei 65 °C hitzeinaktiviert und der Ansatz einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation unterworfen.

2.5.5 Ligation von PCR-Fragmenten via TOPO® PCR Cloning

Eine einfache Variante, um ungeschnittene PCR-Fragmente in einen Vektor zu klonieren, bieten die TOPO® PCR Cloning Kits von der Firma Invitrogen. Dabei ermöglicht es die Methode, in einem Schritt ein PCR-Produkt in einen Vektor zu klonieren und diesen dann direkt in *E. coli* zu transformieren.

Für das TOPO® Cloning wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Vektoren verwendet. Der Vektor pCR®-XL-TOPO® wurde benutzt, um PCR-Fragmente mit T/A-Enden zu klonieren, während der Vektor pCR®-BLUNT II-TOPO® für PCR-Fragmente eingesetzt wurde, welche mittels einer Polymerase amplifiziert wurden, die *blunt*-Enden generiert. Das TOPO® PCR Cloning wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.6 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch *nick translation*

Die Nick-Translation ist eine effektive Methode zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten. Die Reaktion basiert einerseits auf der Aktivität der 5' → 3'-Exonuklease der DNaseI, die dabei in zufälligen Abständen Einzelstrangbrüche (*nicks*) im DNA-Doppelstrang erzeugt und andererseits auf der 3' → 5'-Polymerase-Aktivität der DNA-Polymerase I. Die DNA-Polymerase I hat neben der Exonuklease-Funktion, die einzelne Basen aus dem *nick* in 5'-3'-Richtung entfernt, noch eine Polymerase-Funktion, die neue Nukleotide an das 5'-Ende anfügt sowie eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion. Dabei resultiert die Polymerase-Aktivität in der Übertragung (*translation*) des Einzelstrangbruchs von einer Position innerhalb des DNA-Stranges auf eine andere. Werden dabei neben unmarkierten dNTPs auch radioaktiv markierte dNTPs als Substrat verwendet, führt dies zu einer radioaktiven Markierung der DNA-Fragmente. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNA-Fragmente durch den Einbau von [α -³²P]-dCTP radioaktiv markiert.

Reaktionsansatz:	300 – 500	ng	DNA
	4,5	μ l	dATP, dGTP, dTTP
	30	μ Ci	[α - ³² P]-dCTP
	3	μ l	Enzymlösung
	ad 30	μ l	ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wird für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 μ l STE-Puffer gestoppt und der gesamte Ansatz wird über *ProbeQuandt G-50 Micro columns* (Amersham Biosciences) aufgereinigt.

STE-Puffer:	150	mM	NaCl
	10	mM	Tris-HCl
	1	mM	EDTA
	auf pH 8 einstellen		

2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Verwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht *in vitro* die enzymatische Amplifikation spezifischer DNA, wobei selbst kleinste Nukleinsäuremengen stark vervielfältigt werden können. Bei der PCR wird die DNA-Matrize (*template*) in sukzessiven Zyklen von Denaturierung, *primer annealing* und Polymerisation exponentiell amplifiziert. Durch 20-35 Wiederholungen des Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung von dem 10^6 - 10^7 fachen des ursprünglichen *templates*.

Bei der Denaturierung wird durch kurzzeitiges Erhitzen auf 94 °C die doppelsträngig vorliegende DNA in ihre Einzelstränge überführt. Daran schließt sich die Phase des *primer annealings* an, in der die Hybridisierung zweier komplementärer *primer* stattfindet. Dabei wird durch schnelles Abkühlen auf die Hybridisierungstemperatur und einen großen Überschuss an *primern* die Rückbildung des vorher vorliegenden DNA-Doppelstranges unterbunden. Nun wird ausgehend von den angelagerten *primern* die DNA-Synthese mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase und den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP's) durchgeführt.

Das *template* ist die Ausgangs-DNA, an der die beiden komplementären *primer* gegenläufig binden können. Als *primer* werden meist Oligonukleotide von 15-20 Basenpaaren Länge und nicht zu geringem GC-Gehalt eingesetzt, um zu gewährleisten, dass das *annealing* spezifisch ist. Außerdem soll damit gewährleistet werden, dass das *primer-template*-Paar bei der optimalen Polymerisationstemperatur nicht dissoziiert. Durch Verwendung terminal überhängender *primer* kann die ursprüngliche DNA-Sequenz in der PCR um diesen Überhang verlängert werden. Auf diese Weise lassen sich beispielsweise Schnittstellen für Restriktionsenzyme einführen. Zusätzlich zu *template*, *primern*, DNA-Polymerase und freien dNTP's werden dem PCR-Ansatz noch die entsprechenden Puffer zugefügt. In einem *Thermocycler* wird das Reaktionsgemisch (0,1-1 µg DNA-*template*, 0,1-1 µM *primer*, 200 µM dNTP's und thermostabile DNA-Polymerase) einem zyklisch ablaufenden Temperaturprogramm unterworfen.

Die Dauer und die Temperatur der einzelnen Phasen hängen von dem GC-Gehalt der *primer* und der Länge des gewünschten Amplifikats ab. DNA denaturiert temperaturabhängig von dem GC-Gehalt des Doppelstranges. Für kurze *primer* lässt sich die Schmelztemperatur T_m (in °C) näherungsweise nach folgender Formel berechnen, wobei n die Anzahl des jeweiligen Nukleotid-„Bausteins“ in dem betreffenden *primer* bedeutet:

$$T = [(n \cdot A + n \cdot T) \cdot 2] + [(n \cdot C + n \cdot G) \cdot 4] - 5$$

Für die Zeit der Amplifikation wird eine Rate von 1000 bp/min zugrunde gelegt und entsprechend dieses Wertes berechnet. Durch anschließende gelelektrophoretische Auftrennung können die amplifizierten PCR-Produkte in Bezug auf ihre Größe charakterisiert werden.

Standard-PCR-Ansatz mit Taq-DNA-Polymerase

0,5 – 1	μl	DNA- <i>template</i>
0,6	μl	10 mM dNTP's
1	μl	5'- <i>primer</i> (50 pmol/ μl)
1	μl	3'- <i>primer</i> (50 pmol/ μl)
3	μl	10x Taq-Puffer + MgCl_2
2,4	μl	DMSO
ad 30	μl	ddH ₂ O
+ 0,2	μl	Taq-Polymerase

10x Taq-Puffer:	100	mM	Tris-HCl
	500	mM	KCl
	15	mM	MgCl_2
	1	%	Triton X-100

Der pH-Wert sollte pH 9 betragen; Lagerung bei 4 °C.

Standard-PCR-Ansatz mit dem *FailSafe*TM PCR Enzym Mix

1	μl	DNA- <i>template</i>
1	μl	5'- <i>primer</i> (50 pmol/ μl)
1	μl	3'- <i>primer</i> (50 pmol/ μl)
25	μl	Puffer K/J
ad 30	μl	ddH ₂ O
+ 0,3	μl	<i>FailSafe</i> -Polymerase

Standardtemperaturprogramm einer PCR

Denaturierung vor dem 1. Zyklus	5 min bei 94 °C
Denaturierung	30 sec bei 94 °C
<i>annealing</i>	30 sec bei $T_m - 5$ (abhängig von <i>primern</i>)
<i>primer-extension</i>	30 sec - 2 min bei 72 °C
Beendigung der DNA-Synthese	7 min bei 72 °C

Die PCR besteht in der Regel aus einer Anzahl von 20 bis 50 Zyklen. Die *annealing*-Temperatur wird aus der Basenzusammensetzung der *primer* mittels der 4+2-Regel berechnet. Die Syntheszeit richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA (1 min pro 1 kb). Als Kontrollen werden Ansätze ohne *template*-DNA mitgeführt. Da es wegen der anfänglichen noch niedrigen Temperaturen im PCR-Ansatz zu unerwünschten Nebeneffekten wie Fehlhybridisierung der *primer* oder *primer*-Dimerbildung kommen kann, wird der PCR-Ansatz zunächst für einige Minuten auf 94 °C vorgeheizt. Die Polymerase (gilt vor allem für die *FailSafe*-Polymerase) wird erst bei Erreichen der richtigen Arbeitstemperatur hinzugefügt. Nach Beendigung der PCR werden 5-8 μl des Ansatzes auf einem analytischen Agarosegel überprüft.

2.6.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide stammen hauptsächlich von der Firma Roth. Für die PCR-Reaktion werden die *primer* auf ca. 50 pmol/ μ l in H₂O verdünnt.

***asgA*int+**

5'-**ACG GGC ACG GAG TTC TGC GC**-3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 5'-Bereich der *asgA*-Sequenz in So ce56, 20 nt, Schmelzpunkt (2° + 4°-Regel) = 63 °C

***asgA*int-**

5'-**GCA GAT CGA CAG GCC GAG CC**-3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 3'-Bereich der *asgA*-Sequenz in So ce56, 20 nt, Schmelzpunkt (2° + 4°-Regel) = 63 °C

***bsgA*int+**

5'-**CTG CTC GCG GCG TCG CTG CG**-3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 5'-Bereich der *bsgA*-Sequenz ($\hat{=}$ *lon1*) in So ce56, 20 nt, Schmelzpunkt (2° + 4°-Regel) = 67 °C

***bsgA*int-**

5'-**ACG ATC CGG CCG GGC AGC GC**-3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 3'-Bereich der *bsgA*-Sequenz ($\hat{=}$ *lon1*) in So ce56, 20 nt, Schmelzpunkt (2° + 4°-Regel) = 67 °C

***chivo156* For**

5'-**GGA GAC CCG ATC GAG GTG GA**-3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 5'-Bereich der *chiB*-Sequenz in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR (Kegler et al. 2006), 20 nt, Schmelzpunkt (2° + 4°-Regel) = 63 °C

***chivo 156* Rev**

5'-**GCG TGC CCG ATG TTG GTC TTC**-3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich der *chiB*-Sequenz in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR (Kegler et al. 2006), 21 nt, Schmelzpunkt (2° + 4°-Regel) = 63 °C

***hyg* int-2**

5'-**TCT TCC AAC TGA TCT GC**-3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zur Position 350 *downstream* des *hyg*-Stoppcodons in pSUPHyg, 17 nt, Schmelzpunkt (2° + 4°-Regel) = 45 °C

hyg int+2**5'-CTT CAC CGA CGT CTA TG-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zur Position 728 innerhalb der *hyg*-Sequenz in pSU-PHyg, 17 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 47°C

lon2rt-**5'-GAG GCG GAC GCG CGC CTT-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich des vorderen Bereiches der *lon2*-Sequenz in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 59°C

lon3rt-**5'-CTG CAT CAA CTC GAT GAG-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich des vorderen Bereiches der *lon3*-Sequenz in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 49°C

lon4rt-**5'-CTT GCG GAT GCG CTC CTT-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich des vorderen Bereiches der *lon4*-Sequenz in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 53°C

lon5rt-**5'-CAG CGC GAG GCT GCG CAT-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich des vorderen Bereiches der *lon5*-Sequenz in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 58°C

lon3int-**5'-GTG GTT CTG CTC CGG ATC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 3'-Bereich der *lon3*-Sequenz in So ce56, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 53°C

lon2stop-tag**5'-CAC CCC CGC CTG CTC CTC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich der *lon2*-Sequenz in So ce56, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 59°C

MxSc16SRT+(935)**5'-CGC AAC GCG CAG AAC CTT AC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 5'-Bereich (Position 935) von 16S in *So ce56* und *M. xanthus*, verwendet für Real-time RT-PCR, 20 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 59°C

MxSc16SRT-(1079)**5'-GCT CGT TGC GGG ACT TAA CC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich (Position 1079) von 16S in *So ce56* und *M. xanthus*, verwendet für Real-time RT-PCR, 20 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 59°C

pSupHind+**5'-GTA GCA CCT GAA GTC AGC CC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu der Position 3451 des Konjugationsvektors pSU-PHyg, *sense*; 20 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 59°C

pSupHygSph**5'-CAG TAG TAG GTT GAG GCC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu der Position 4085 des Konjugationsvektors pSU-PHyg, *antisense* 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 51°C

socelon-**5'-GTT CTG C(GT)C CGG ATC (GC)AG-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 3'-Bereich der *lon*-Sequenzen in *So ce56*, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 53°C

socelon2+**5'-GAG GCG ACG CGC GAG GTG-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 5'-Bereich der *lon2*-Sequenz in *So ce56*, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 59°C

socelon3+**5'-TCG ACG TTC GAG ATG TAC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 5'-Bereich der *lon3*-Sequenz in *So ce56*, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 49°C

socelon4+**5'-GAC ATC GCG AAG CAG GTC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 5'-Bereich der *lon3*-Sequenz in *So ce56*, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 53°C

socelon5+**5'-GAG CGG GCC GTC GAG TAC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 5'-Bereich der *lon5*-Sequenz in So ce56, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 57°C

socelon2start**5'-ATG CCG ACC GGC GAT CC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 5'-Bereich der *lon2*-Sequenz in So ce56, 17 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 53°C

SasgAstart**5'-ATG ACG CGC GCC TCC GGC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 5'-Bereich der *asgA*-Sequenz in So ce56, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 59°C

SasgAstop**5'-CTA CAC CGC GGG TCG CTC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich der *asgA*-Sequenz in So ce56, 18 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 57°C

SocebsgArt+**5'-CGT TCG TCG ATC ACT ACC TG-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 5'-Bereich des vorderen Bereiches der *lon1*-Sequenz in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR. 20 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 57°C

SocebsgArt-**5'-GGC AGA GCT TCT TGA TCT CG-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich des vorderen Bereiches der *lon1*-Sequenz in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR. 20 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 57°C

16s2 For**5'-TGG ACG GTG ACT GAC GCT GAG A-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 5'-Bereich von 16S in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR (*asgA*) (Kegler et al. 2006). 22 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 65°C

16s2 Rev**5'-CAT CGT TTA CGG CGT GGA CTA CC-3'**

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu dem 3'-Bereich von 16S in So ce56, verwendet für Real-time RT-PCR (*asgA*) (Kegler et al. 2006). 23 nt, Schmelzpunkt ($2^\circ + 4^\circ$ -Regel) = 67°C

2.6.2 PCR-Schnelltest zur Selektion rekombinanter *E. coli*- Klone

Mit dieser Methode kann schnell überprüft werden, ob Klone über ein *insert* verfügen oder nicht. Dafür werden Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Transformationsplatte abgenommen und a.) in ein steriles PCR-Cup überführt und b.) gleichzeitig auf einer so genannten *masterplate* ausgestrichen. Die Klone, die per PCR als richtig identifiziert werden, können dann von der inzwischen inkubierten *masterplate* abgeimpft werden.

2.6.3 PCR-Schnelltest zur Charakterisierung von *S. cellulosum* -Mutanten

Ebenso wie für *E. coli*-Klone, können auch potentielle Mutanten von *S. cellulosum* mittels PCR-Schnelltest überprüft werden. Dafür werden Proben der Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen, in etwa 100 μ l Zellaufbruchpuffer (siehe 2.8.1.1) überführt und resuspendiert. Nach kurzem Aufkochen der Proben in einem handelsüblichen Wasserkocher, können kleine Mengen der Suspensionen in die PCR eingesetzt werden.

2.6.4 Real-time RT-PCR

Die Real-time RT-PCR ist eine schnelle und sensitive Methode und erlaubt die Quantifizierung von sowohl gering exprimierten Transkripten wie auch von geringen Veränderungen in der Genexpression (Pfaffl 2001). Bei der Real-time RT-PCR erfolgt die Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation während der log-linearen Phase der Reaktion mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes SYBR[®] Green I. Das SYBR[®] Green I bindet dabei unabhängig in der *minor-groove* der entstehenden dsDNA (Wilhelm & Pingoud 2003). Das Signal, des durch blaues Licht (480 nm) angeregten Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®] Green I korreliert quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann mit Hilfe einer Software dargestellt werden.

Zur Analyse der Genexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit die relative Quantifizierung nach dem mathematischen Modell von Pfaffl (Pfaffl 2001) verwendet. Dieses basiert auf dem Bezug der relativen Expression des Zielgens zu der des Referenzgenes. Der Expressionslevel eines idealen Referenzgenes sollte demnach unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konstant bleiben. Neben ribosomaler RNA dienen vorzugsweise *housekeeping*-Gene als interne Kontrollen. Zur Normalisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit 16S rRNA als interne Referenz genutzt, dessen Expression sich im Verlauf der jeweiligen Experimente nicht verändert.

Für die Real-time RT-PCR wurde der QIAGEN[®] OneStep RT-PCR Kit verwendet. Dieser ermöglicht die reverse Transkription sowie die nachfolgende PCR in einem Schritt, da beide Enzyme in dem mitgelieferten Enzym-Mix vorliegen. Die ebenfalls in dem Enzym-Mix enthaltene HotStarTaqTM DNA-Polymerase ist zum Zeitpunkt der reversen Transkription noch vollkommen inaktiv und wird erst durch eine dem RT-Schritt nachfolgende Inkubation bei 95 °C für 15 min aktiviert, wobei eine gleichzeitige Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgt. Die *annealing*-Temperatur der *primer* sowie die Anzahl der Zyklen für die anschließende PCR wird für jedes zu untersuchende Gen einzeln bestimmt.

Standard Real-time RT-PCR-Ansatz

40	ng/ μ l	Gesamt-RNA
2	μ l	5x OneStep RT-PCR Puffer
0,4	μ l	10 mM dNTP's
1,2	μ l	3'- <i>primer</i> (10 pmol/ μ l)
1,2	μ l	5'- <i>primer</i> (10 pmol/ μ l)
0,4	μ l	OneStep RT-PCR Enzym-Mix
2	μ l	5x Q-Solution
0,1	μ l	RNasin (5 U/20 μ l); Fermentas
0,2	μ l	SYBR [®] Green I (1:1000)
ad10	μ l	RNase-freies ddH ₂ O
+ 0,2	μ l	Taq-Polymerase

Standardtemperaturprogramm einer Real-time RT-PCR

Reverse Transkription	30 min bei 50 °C
Aktivierung der HotStarTaq [®] DNA-Polymerase	15 min bei 96 °C
Denaturierung	15 sec bei 94 °C
<i>annealing</i>	30 sec bei T _m -5 (abhängig von <i>primern</i>)
<i>primer-extension</i>	30 sec - 2 min bei 72 °C
Beendigung der DNA-Synthese	3 min bei 72 °C

Die Real-time RT-PCR besteht in der Regel aus bis zu 45 Zyklen.

Für die Real-time RT-PCR wird der Rotor-Gene 3000TM Real Time Thermal Cycler von Corbett Research verwendet. Die einzelnen Experimente werden anhand der mitgelieferten Software Rotor-GeneTM 4.6 ausgewertet und analysiert. Die relative Quantifizierung der Ergebnisse erfolgt nach der mathematischen Formel von Pfaffl (Pfaffl 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Ziel}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Ziel}}(t_0 - t_x)}}{(E_{\text{Referenz}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Referenz}}(t_0 - t_x)}}$$

E	Effizienz der Real-time RT-PCR für Zielgen und Referenz
CP	<i>crossing point</i> (Punkt, an dem die Fluoreszenz ihren Signal-Schwellenwert erreicht; wird als Zyklenzahl angegeben.)
t	CP zum Zeitpunkt t ₀ bzw. t _x

Für die Berechnung der relativen Expression des zu untersuchenden Genes unter den jeweiligen verschiedenen Bedingungen wird die relative Expression der unbehandelten Kontrolle bzw. des Zeitpunktes t_0 als 1 definiert. Alle weiteren Zu- oder Abnahmen der Expression des zu untersuchenden Genes werden dann im Verlauf des Experimentes auf diesen Wert bezogen.

Um die Amplifikationseffizienz der Real-time RT-PCR zu ermitteln, werden Verdünnungsreihen an Gesamt-RNA (8 ng; 4 ng; 2 ng; 0,8 ng; 0,4 ng und 0,2 ng Gesamt-RNA) hergestellt und diese in die Real-time RT-PCR eingesetzt. Die Amplifikationseffizienz wird durch die Software Rotor-GeneTM 4.6 ermittelt.

2.7 Überexpression von Fremdproteinen in *E. coli*

Zur Überexpression von Fremdproteinen in *E. coli* wurde das Strep-tag/Strep-Tactin System der Firma IBA GmbH verwendet. Das System beinhaltet verschiedene pASK-IBA-Expressionsvektoren, die sich hinsichtlich des Ortes der Expression (Zytoplasma oder Periplasma), der Möglichkeit der C-terminalen oder N-terminalen Fusion des Strep-tag-II Peptids, und der Anordnung einzelner Schnittstellen für den Faktor Xa unterscheiden. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pASK-IBA3 erlaubt die zytoplasmatische Expression eines rekombinanten Proteins mit einem C-terminalen Strep-tag (pASK-IBA3).

Die Zellanzucht und die Überexpression erfolgt nach Angaben des Herstellers und wurde dem Handbuch „*Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag*“ der IBA GmbH entnommen.

2.7.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Strep-tag wurde ebenfalls das Strep-tag/Strep-Tactin System der Firma IBA GmbH verwendet. Dieses System beruht auf einer selektiven Bindung des Strep-tag an das Protein Streptavidin (Strep-Tactin). Die Aufreinigung des Proteins erfolgt unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie (siehe 2.11.1). Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers und wurde dem Handbuch „*Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag*“ der IBA GmbH entnommen. Anschließend können die einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen anhand einer SDS-Gelelektrophorese analysiert werden.

2.8 Proteinanalysen

2.8.1 Herstellung von Proteinextrakten

2.8.1.1 Zellaufschluss im RiboLyser

Für die Gewinnung von Proteinextrakten aus ganzen Zellen werden die Zellen zunächst pelletiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Aufbruch der Zellen erfolgt nach Zugabe eines Volumenteils Glasperlen (0,1 mm im Durchmesser; Braun) und Überschichtung

mit 100 μ l Zellaufbruchpuffer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durch ein Schüttelgerät in 5 x 5 sec mit 3 Wiederholungen auf Stufe 6,5 (RiboLyser, Hybaid-AGS, Heidelberg). Nach den ersten 5 sec setzt man den Proben den Proteasehemmer PMSF in einer Endkonzentration von 0,1 mM zu. Um die Proteine nicht zu schädigen, werden die Proben auf Eis gekühlt. Nach Zellaufbruch durch den RiboLyser werden die Proben für 3 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Zellrückstände und Glasperlen zu sedimentieren. Der proteinhaltige Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und weiterhin auf Eis gelagert oder bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren. Wahlweise kann der Aufbruch der Zellen auch durch Ultraschallpulse erfolgen.

Zellaufbruchpuffer:	50	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	4	mM	EDTA
	1	mM	DTT
	1	mM	Benzamidin
	ad 100	ml	ddH ₂ O

PMSF (100 mM):	0,1742	g	PMSF
	ad 10	ml	96 % Ethanol

2.8.1.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Für die Gewinnung von Proteinextrakten aus größeren Zellmengen erfolgt der Zellaufschluss mittels Ultraschall. Hierfür werden die Zellen ebenfalls zunächst pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Sediment wird zum Zellaufschluss in einer adäquaten Menge an Zellaufbruchpuffer (siehe 2.8.1.1) mit 0,1 mM PMSF resuspendiert und durch Ultraschall aufgebrochen. Die Intensität des Ultraschalls beträgt dabei 70 % für je 30 sec. Der Vorgang wird insgesamt fünfmal mit je einer einminütigen Pause wiederholt. Um nach der Ultraschallbehandlung etwaige Zelltrümmer zu entfernen, wird der ganze Ansatz für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wird anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.8.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Mit Hilfe der colorimetrischen Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) lässt sich die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmen. Diese Methode beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm auf 595 nm verschiebt, wenn eine Bindung an basische und aromatische Aminosäurereste stattfindet. Die Vorteile dieser Methode sind, dass durch die Sensitivität der Methode schon wenige μ g an Protein nachgewiesen werden können. Außerdem ist das Absorptionsmaximum des Protein-Farbstoff-Komplexes bereits nach ca. 2 min erreicht und bleibt für etwa eine Stunde konstant.

Für die Proteinbestimmung nach Bradford muss zunächst eine Eichkurve mit definierten Proteinkonzentrationen erstellt werden. Eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml dient dabei als Eichprotein. Ausgehend von dieser BSA-Stammlösung werden verschiedene Verdünnungen hergestellt, die in einem Diagramm gegen die Absorption aufgetragen werden. Anhand der Steigung der Geraden wird ein Faktor ermittelt, mit dem man die Absorption der Proben multipliziert, um den Proteingehalt der Probe zu ermitteln.

$$\text{OD}_{595} \cdot \text{ermittelter Faktor} = \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l Protein im Test}}$$

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration werden in einer Küvette jeweils 1 μl der Probe in 799 μl ddH₂O aufgenommen. Zusätzlich werden 200 μl Bradford-Reagenz (Coomassie) hinzugegeben und die Proben gut vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm die Absorption gegen den Leerwert bestimmt. Liegt der gemessene Wert außerhalb des linearen Bereichs des Tests (1-20 μg Protein in der Probe), muss die einzusetzende Menge angepasst werden und eine erneute Bestimmung erfolgen.

Um die Genauigkeit zu erhöhen, werden Parallelbestimmungen sowohl für die Eichkurve, als auch für die zu bestimmenden Proben durchgeführt und die Messwerte gemittelt.

2.8.3 Dialyse von Proteinlösungen

Bei der Dialyse werden niedermolekulare Stoffe aus der Proteinlösung entfernt bzw. andere hinzugefügt und sie kann somit als ein Standardverfahren für die Entsalzung oder Umpufferung aber auch für die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen verwendet werden. Für die Dialyse werden semipermeable Membranen verwendet, welche anorganische Salze und andere niedermolekulare Verbindungen durchtreten lassen können, jedoch je nach Ausschlussvolumen keine Proteine. In dieser Arbeit werden die Dialysemembranen ZelluTrans von der Firma Roth mit einem Ausschlussvolumen von 8,000 - 10,000 Da verwendet.

Vor der Verwendung der Dialysemembranen werden diese zunächst in 20 %igem Ethanol eingelegt und vor direktem Gebrauch mehrfach mit dH₂O gespült. Das Volumen des Dialysepuffers beträgt etwa das 200fache der Proteinlösung und wird während der Dialyse mehrfach ausgetauscht, um den Vorgang zu beschleunigen. Die Dialyse wird bei 4 °C im Kühlraum unter Rühren durchgeführt.

Dialysepuffer:	20	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	20	mM	NaCl
	50	%	Glycerin
	1	mM	Benzamidin
	1	mM	DTT
	0,1	mM	EDTA

2.8.4 Fällung von Proteinen durch Aceton

Zur Fällung von Proteinen wird zu der Proteinlösung das 3 fache Volumen an eiskaltem Aceton zugegeben und für mindestens 2 h bei -20 °C inkubiert. Im Anschluss daran, wird die Lösung bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene farblose Pellet wird an der Luft oder in der Vakuumzentrifuge vorsichtig getrocknet und kann dann weiter verwendet werden.

2.8.5 Proteinfraktionierung durch Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der fraktionierten Pelletierung durch Zentrifugation lassen sich komplexe Gemische wie z. B. Proteinextrakte, in ihre einzelnen Komponenten auftrennen.

Für die Proteinfraktionierung werden die Zellen in dem entsprechenden Medium bis Erreichen der exponentiellen Phase angezogen und 30 ml der Kultur bei 10.000 rpm bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wird daraufhin in 5 ml Resuspensionspuffer I aufgenommen und anschließend für 30 min und 4 °C mit Lysozym (Endkonzentration 600 µg/ml) behandelt. Durch Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4 °C für 10 min erfolgt die erste Fraktionierung des Proteinextraktes in Periplasma (Überstand) und Sphäroplast (Zellsediment). Die periplasmatische Fraktion wird bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt. Das Zellsediment wird nun in 1 ml Resuspensionspuffer II resuspendiert und für 15 sec mit Ultraschall behandelt. Zelltrümmer und nicht vollständig aufgebrochene Zellen werden durch Zentrifugation (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) entfernt. Der nun zellfreie Extrakt wird anschließend durch Ultrazentrifugation (Optima™ TLX Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Rotor TLA 100-1) bei 58.000 rpm und 4 °C für 1 h getrennt. Der erhaltene Überstand nach der Ultrazentrifugation beinhaltet cytoplasmatische Proteine, während das Zellsediment sich aus Membranproteinen zusammensetzt. Die „Membran“-Fraktion wird zur Lagerung in Resuspensionspuffer II aufgenommen. Alle Fraktionen werden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Resuspensionspuffer I:	500	mM	Saccharose
	1	mM	EDTA
	50	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1	mM	PMSF

Resuspensionspuffer II	50	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1	mM	EDTA
	1	mM	PMSF

2.8.6 Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) ist die am weitesten verbreitete Elektrophoresetechnik und dient der Proteinanalyse (Laemmli 1970). Die Trennung der Proteine erfolgt unter denaturierenden Bedingungen anhand des Molekularge-

wichtiges. Das anionische Denaturierungsdetergenz SDS kann durch Anlagerung an die Proteine diese in eine gestreckte Form (Primärstruktur) und gleichzeitig in eine Anionenform umwandeln. Dabei entstehen Proteinanionen, bei denen die Größe der Ladung proportional zu ihrer Molekülgröße ist.

Die hohe Trennschärfe dieser Methode wird durch die Diskontinuität der Gele erreicht. Diese bestehen aus Bereichen unterschiedlicher Porengröße, dem großporigen Sammelgel (Tris-Puffer, pH 6,8) und dem kleinporigen Trenngel (Tris-Puffer, pH 8,8).

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wird in vertikalen Elektrophoresegelekkammern der Firma BioRad mit einer Gelgröße von 10,2 cm x 7,3 cm durchgeführt.

Die Zusammensetzung der Gele aus den im Folgenden aufgeführten Lösungen sind in Tab. 2.7 dargestellt. Die Angaben in der Tabelle beziehen sich auf 10 ml Trenngel und 4 ml Sammelgel.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Lösungen für 10 und 12 %ige SDS-Gele

Lösungen	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12 %	5 %
H₂O	4,0 ml	3,3 ml	2,7 ml
30 % Acrylamid-Mix	3,3 ml	4,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	-	0,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml

Die Prozentangabe für den Acrylamid-Mix (Acrylamidlg. : Bisacrylamid [37,5 : 1]) bezieht sich auf (w/v).

Das Trenngel wird bis ca. 2 cm unterhalb der Gelkante gegossen und dann mit 1-Butanol überschichtet, um eine gerade Gelkante zu bekommen und Sauerstoff fern zu halten. Ist das Trenngel auspolymerisiert, wird das Sammelgel bis zur Gelkante gegossen. Der Probenauftragskamm wird möglichst gerade und ohne Luftblasenbildung eingeschoben. Nach vollständiger Polymerisation kann die Apparatur in eine BioRad-Gellaufvorrichtung eingespannt, mit 1x Tris-Glycin-SDS-Puffer überschichtet und der Probenauftragskamm entfernt werden. Der Boden der Laufkammer wird ebenfalls mit Puffer befüllt.

Zur Vorbereitung der Proben werden diese mit 5x SDS-Auftragspuffer versetzt und 10 min bei 100 °C denaturiert. Der Gellauf erfolgt nach Auftrag der Proben mit 80 V im Sammelgel und 150 V im Trenngel. Der Nachweis der Proteine erfolgt entweder durch Färbung der SDS-Gele oder anhand einer anschließenden *Western Blot*-Analyse.

10x Tris-Glycin-SDS Puffer: 250 mM Tris
1,92 M Glycin
1 % SDS

5x SDS-Auftragspuffer: 0,225 M Tris-HCl, pH 6,8
 50 % Glycerin
 5 % SDS
 0,05 % Bromphenolblau
 0,25 M DTT

2.8.7 Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen

Bei der Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen bzw. unter nativen Bedingungen bleibt die Konformation der Proteine erhalten und die Trennung wird hierbei durch verschiedene Faktoren, wie Molekülgröße, Molekülform sowie Molekülladung beeinflusst. Um diese Faktoren zu minimieren, werden häufig Polyacrylamidgele von niedriger Konzentration und Vernetzung verwendet.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen wird in vertikalen Elektrophoresegelelektrophoresekammern der Firma BioRad mit einer Gelgröße von 10,2 cm x 7,3 cm durchgeführt.

Die Zusammensetzung der Gele aus den im Folgenden aufgeführten Lösungen sind in Tab. 2.7 dargestellt. Die Angaben in der Tabelle beziehen sich auf ein Trenngel und ein Sammelgel. Die Prozentangabe für den Acrylamid-Mix (Acrylamidlg. : Bisacrylamid [37,5 : 1]) bezieht sich auf (w/v).

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der Lösungen für ein 7,5 %iges Nativgel

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
H₂O	1,45 ml	1,66 ml
30 % Acrylamid-Mix	1,5 ml	0,5 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	3 ml	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	312,5 µl
10 % APS	30 µl	12,5 µl
5 % NP40	60 µl	25 µl
TEMED	6 µl	2,5 µl

Das Trenngel wird bis ca. 2 cm unterhalb der Gelkante gegossen und dann wie unter 2.8.6 beschrieben, weiterbehandelt. Nach vollständiger Polymerisation kann die Apparatur in eine BioRad-Gellaufvorrichtung eingespannt, mit Laufpuffer überschichtet und der Probenauftragskamm entfernt werden. Der Boden der Laufkammer wird ebenfalls mit Puffer befüllt.

Zur Vorbereitung der Proben werden diese mit 2x Nativproben-Auftragspuffer versetzt. Der Gellauf erfolgt nach Auftrag der Proben mit 80 V im Sammelgel und 140 V im Trenngel. Nach vollendeter Gelelektrophorese werden die Proteinbanden durch *Western Blot*-Analysen detektiert.

Laufpuffer: 25 mM Tris
1,92 M Glycin

2x Nativproben-Auftragspuffer: Mischung aus 2x Puffer I, 2x Puffer II
und 2x Puffer III im Verhältnis 5:5:1

2x Puffer I: 100 mM Tris-HCl, pH 6,8
40 % Glycerin
0,05 % Bromphenolblau

2x Puffer II: 100 mM K_3PO_4 , pH 7,4
10 mM $MgCl_2$
10 mM DTT
1 mM EDTA
100 mM KCl
4 mM Benzamidin

2x Puffer III: 80 $\mu g/\mu l$ BSA in Puffer I

2.8.8 Färbemethoden für Polyacrylamidgele

2.8.8.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung beruht auf der reversiblen Anlagerung des Farbstoffs an Amino-Gruppen der Proteine. Für das Anfärben der Proteinbanden mit Coomassie wird das Polyacrylamidgel für eine bis mehrere Stunden in der Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird die überschüssige Farbe durch Schütteln in Entfärbelösung wieder entfernt. Die Entfärbelösung wird dabei mehrere Male gewechselt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei 200-400 ng/Proteinbande.

Färbelösung: 0,06 % Coomassie[®] brilliant blue G 250
50 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärbelösung: 5 % Methanol
7,5 % Essigsäure

2.8.8.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung basiert auf der Komplexbildung von Ag^+ -Ionen mit Aminosäureketten. Sie ist bedeutend empfindlicher als die Coomassie-Färbung. Für die Silberfärbung werden die Proteine zunächst mit Fixierer für 30 min im Polyacrylamidgel unter leichtem Schütteln fixiert. Durch die Behandlung mit Fixierer werden die Proteine denaturiert und fallen aus. Nach zweimaligem Waschen für je 10 min in 50 %igem Ethanol wird das Polyacrylamidgel für 1 min in $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ geschüttelt. Anschließend wird das Polyacrylamidgel mehrmals in dH_2O gewaschen und für 15 min in Silbernitratlösung inkubiert. Überschüssige Ag^+ -Ionen werden danach wieder durch mehrmaliges Waschen in dH_2O entfernt und es erfolgt der Entwicklungsschritt. Dafür wird das Polyacrylamidgel in Entwickler so lange geschüttelt, bis die Proteine sichtbar werden. Durch EDTA im Stopp-Puffer wird diese Reaktion letztendlich abgestoppt.

Fixierer: 50 % Methanol
 12 % Essigsäure
 0,5 ml/l Formaldehyd

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$: 0,2 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Silbernitrat: 0,2 g/100 ml Silbernitrat

Entwickler: 6 % Na_2CO_3
 0,05 % Formaldehyd
 2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung

Stopp-Puffer: 50 mM EDTA

2.8.9 Demodifikationsassay

Für die Bestimmung der Modifikation des P_{II} -Proteins in So ce56 wird ein sogenannter enzymatischer Demodifikationsassay durchgeführt.

Zum Nachweis einer Modifikation von P_{II} in Form einer Uridylierung wird *snake venom* Phosphodiesterase (USB) verwendet. Die Phosphodiesterase demodifiziert nukleotidylierte Proteine (uridylierte bzw. adenylierte Proteine). Für den Nachweis einer vorliegenden Phosphorylierung wird die alkalische Phosphatase (MBI; Fermentas) eingesetzt, welche Phosphoproteine demodifiziert. In beiden Fällen zeigt sich ein positives Ergebnis (Demodifikation) in Form eines *mobility shifts* zu einer langsameren Laufform in einer Gelelektrophorese unter dichtenaturierenden Bedingungen.

Pro Versuchsansatz werden 60 μg Gesamtprotein von So ce56 eingesetzt und jeweils 1 U der *snake venom* Phosphodiesterase (SVD) bzw. der alkalischen Phosphatase (CIAP). Als Positivkontrolle für die Deuridylierung dient ein Proteinextrakt von in Minimalmedium angezogenen *E. coli* BL21-Zellen. Von diesem werden 0,8 μg Gesamtprotein eingesetzt. Das P_{II} -Protein sollte nach Anzucht der Zellen in Minimalmedium in der 3fach uridylierten Form vorliegen.

Für den Nachweis einer Dephosphorylierung wird ein Proteinextrakt der *pphA*-Mutante von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (persönlich erhalten von Nicole Kloft) als Positivkontrolle eingesetzt. Der Stamm wurde ebenfalls unter nährstofflimitierten Bedingungen angezogen, so dass P_{II} in 3fach phosphorylierter Form vorliegt. Als Negativkontrolle dient in beiden Fällen ein Ansatz ohne Zugabe des jeweiligen Enzyms jedoch in dem jeweils für die Reaktion verwendeten Reaktionspuffer. Die Reaktionsansätze werden für 90 min bei 37 °C inkubiert und der P_{II} -Modifikationsstatus in einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese mit anschließendem *Western Blot* analysiert.

SVD-Resuspensionspuffer:	110	mM	Tris-HCl, pH 8,8
	110	mM	NaCl
	15	mM	MgCl ₂
	50	%	Glycerin

Die gelöste SVD wird bis zur weiteren Benutzung bei -20 °C gelagert.

5x SVD-Reaktionspuffer:	500	mM	Tris-HCl, pH 9,0
	50	mM	MgCl ₂

10x CIAP-Reaktionspuffer:	100	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	100	mM	MgCl ₂

2.9 Immunologische Methoden

2.9.1 *Western Blot*- Analyse von Proteinen (*Western Blot*)

Unter dem Begriff *Western Blot* versteht man den elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Membran. Mit Hilfe eines *Western Blots* können Proteine über eine immunologische Reaktion mit einem Antikörper nachgewiesen werden.

***Western Blot* mit Tris-PM-Puffer und PVDF-Membran:**

Für den *Western Blot* werden die Proteine zunächst auf einem SDS-Polyacrylamidgel für 2-3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei werden pro Gelspur 30 μg Protein aufgetragen. Anschließend erfolgt eine 20minütige Inkubation des Gels in Transferpuffer und der Transfer

der Proteine auf die PVDF-Membran der Firma Roche. Der Transfer erfolgt im Semi-Trocken-Verfahren mit einer *Blot*-Apparatur der Firma Keutz.

Zunächst entfernt man von dem zu blottendem Proteingel das Sammelgel. Die PVDF-Membran und 6 Lagen 3 mm Whatman-Papier werden auf Gelgröße zugeschnitten. Um die beim Transfer störenden Salze zu entfernen, wird das Gel nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer für 20 min in Transferpuffer inkubiert. Die Membran wird kurz in Methanol gelegt und dann ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Kurz vor Ablauf der 20minütigen Inkubation werden auch die 6 Lagen Whatman-Papier in den Transferpuffer gelegt.

Für den Semi-Trocken-*Blot* werden zunächst drei, der mit Transferpuffer getränkten Stücke Whatman-Papier übereinander gelegt. Darauf wird die PVDF-Membran gelegt, gefolgt von dem Gel und weiteren drei Lagen Whatman-Papier (siehe Abb. 2.2(a)). Damit ein Abfließen des Stromes verhindert wird, sollte darauf geachtet werden, dass sämtliche Bestandteile des Aufbaus die gleiche Größe aufweisen. Der Transfer der Proteine erfolgt von der Kathode (-) zur Anode (+) und damit vom Gel auf die Membran. Geblottet wird bei einer Stromspannung von 25 V für ca. 45 min. Die angelegte Stromstärke beträgt 0,8 mA/cm² Gelfläche.

Alle nun folgenden Schritte erfolgen auf einem Schüttler. Zwischen den einzelnen Schritten wird jeweils dreimal für 5 sec mit ddH₂O gewaschen. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgt eine einstündige Inkubation der Membran in Transferpuffer mit Magermilchpulver, wodurch unspezifische Bindestellen abgesättigt werden. Danach erfolgt die Inkubation mit dem 1. Antikörper in Tris-PM über Nacht. Am nächsten Tag wird die Membran für 1 h in Tris-PM mit 0,1 % Tween gewaschen. Nun erfolgt die Zugabe des 2. Antikörpers (z. B. Anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat, von BioRad; 1:10000 in Tris-PM). Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wird die Membran nochmals für 1 h in Tris-PM gewaschen. Die Detektion des Antikörper-Enzym-Konjugats erfolgt wie unter 2.9.1.1 beschrieben.

Transferpuffer:	48	mM	Tris, pH 9,2
	39	mM	Glycin
	0,0375	%	SDS
	20	%	Methanol
	ad 500	ml	ddH ₂ O

Tris-PM:	20	mM	Tris
	250	mM	NaCl
	mit HCl auf pH 7,5 einstellen		
	95,8	g	Milchpulver pro Liter

Western Blot mit TBS-Puffer und Nitrocellulose-Membran:

Diese Art des *Western Blots* wurde im Rahmen dieser Arbeit vor allem für die Detektion von Proteinen nach einer Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen durchgeführt.

Für den *Western Blot* werden die Proteine zunächst auf einem nativen Polyacrylamidgel

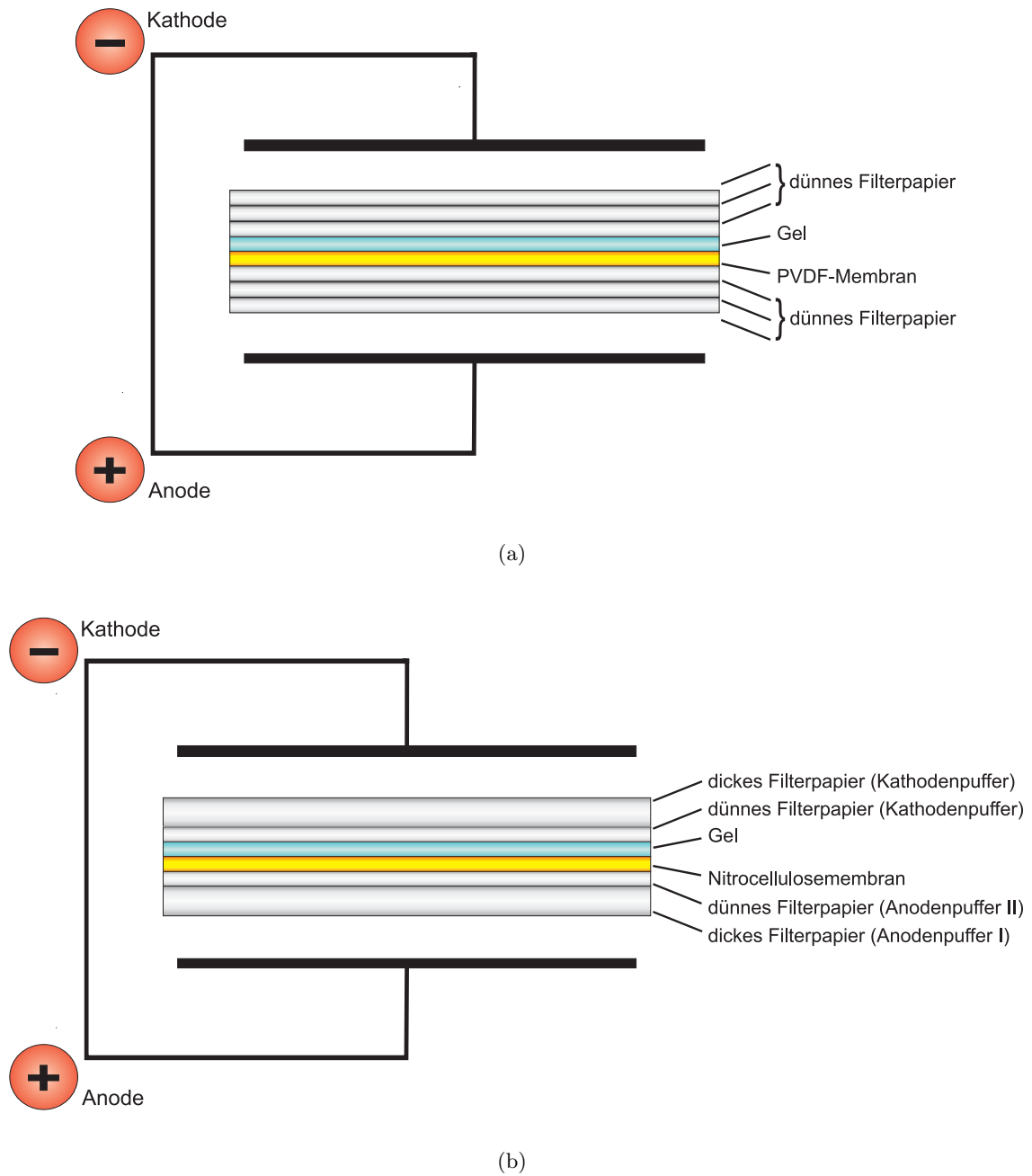


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau von zwei unterschiedlichen *Western Blots*. Abbildung 2.2(a) zeigt den Aufbau eines *Western Blots* mit PVDF-Membran und Abbildung 2.2(b) zeigt den schematischen Aufbau eines *Western Blots* mit Nitrocellulose-Membran.

für 2-3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei werden pro Gelspur 30-60 μg Protein aufgetragen. Nach einer 10minütigen Inkubation der Nitrocellulose-Membran in dH_2O erfolgt der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran der Firma Schleicher und Schuell nach dem Semi-Trocken-Verfahren mit einer *Blot*-Apparatur der Firma Keutz.

Zunächst entfernt man von dem zu blottendem nativen Polyacrylamidgel das Sammelgel. Die Nitrocellulose-Membran sowie 2 Lagen dünnes Whatman-Papier und 2 Lagen dickes Whatman-Papier werden auf Gelgröße zugeschnitten. Die Membran wird für 10 min in dH_2O inkubiert. Für den Semi-Trocken-*Blot* wird der *Western Blot*, wie in Abbildung 2.2(b) B schematisch dargestellt, aufgebaut. Zuvor werden die Whatman-Papiere noch kurz in dem jeweiligen Puffer inkubiert. Die Zuordnung der Puffer ist der graphischen Abbildung 2.2(b) zu entnehmen. Der Transfer der Proteine erfolgt von der Kathode (-) zur Anode (+) und damit vom Gel auf die Membran. Geblottet wird bei einer Stromspannung von 20 V für 30 min. Die angelegte Stromstärke beträgt $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche.

Alle nun folgenden Schritte erfolgen auf einem Schüttler. Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgt eine halbstündige Inkubation der Membran in 10 %iger Milch-TBS-Lösung, wodurch freie Bindestellen abgesättigt werden. Danach erfolgt die Inkubation mit dem 1. Antikörper in 1 %iger Milch-TBS-Lösung über Nacht. Am nächsten Tag erfolgt nach dreimaligem Waschen mit TBS die Zugabe des 2. Antikörpers (z. B. Anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat, von BioRad; 1:10000 in 1 % Milch-TBS-Lösung). Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wird die Membran erneut dreimal mit TBS und zweimal mit dH_2O gewaschen, um alle unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen.

Die Detektion des Antikörper-Enzym-Konjugats erfolgt wie unter 2.9.1.1 beschrieben.

TBS:	20	mM	Tris, pH 7,4
	0,9	%	NaCl

Anodenpuffer I:	300	mM	Tris
	20	%	Methanol

Anodenpuffer II:	25	mM	Tris
	20	%	Methanol

Kathodenpuffer:	25	mM	Tris
	20	%	Methanol
	40	mM	ϵ -Amino-n-Caprinsäure

2.9.1.1 Detektion des Antikörper-Enzym-Konjugats

Der Nachweis des Antikörper-Enzym-Konjugats erfolgt mittels ECL-Detektionslösung. Das ECL-Detektionsreagenz besteht zu gleichen Teilen aus einer H_2O_2 -Lösung (ECL 1) sowie ei-

ner Luminol-Lösung (ECL 2). Das in der Lösung ECL 1 enthaltene H_2O_2 ist das Substrat der an den zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase. Die Peroxidase katalysiert hierbei in Anwesenheit von H_2O_2 , die Oxidation von zyklischem Diacylhydrazin-Luminol, was zur Emission von Licht führt (Chemolumineszenz).

Zur Detektion des Antikörper-Enzym-Konjugats mischt man zu gleichen Teilen beide Lösungen zusammen und bedeckt die Membran damit. Nach 2 min lässt man die Lösung von der Membran abtropfen und legt diese zwischen zwei transparente Folien. Zum Schluss streicht man Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit aus und exponiert die Membran für 15-30 min auf einem Röntgenfilm (Kodak Biomax Light).

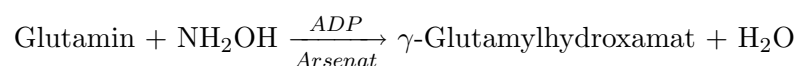
ECL 1: 2,5 mM Luminol
 0,4 mM Paracoumarinsäure
 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

ECL 2: 5,4 mM H_2O_2
 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

2.10 Enzymaktivitätstests

2.10.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Glutaminsynthetase

Der Glutaminsynthetasetest basiert auf der Fähigkeit der Glutaminsynthetase anstelle von NH_3 auch NH_2OH umzusetzen. Dabei wird, in der Umkehrung der eigentlichen Reaktion, Glutamin quantitativ in γ -Glutamylhydroxamat überführt. Das entstehende γ -Glutamylhydroxamat bildet zusammen mit Fe^{3+} -Salzen einen stark gefärbten Komplex, dessen Konzentration bei 540 nm photometrisch bestimmt werden kann. Dieser quantitative Glutaminsynthetase-Test lässt jedoch nur einen Rückschluss auf die gesamte Glutaminsynthetase-Aktivität zu, da sowohl die adenylierte als auch die deadenylierte Form der Glutaminsynthetase in diesem Test aktiv sind (Stadtman et al. 1970).



Die Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität wurde nach Pahel et al. (1982) durchgeführt. Für den Test werden je viermal 1 ml Zellen abzentrifugiert, kurz in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und dann bei -20°C weggefroren.

Sind alle Proben gesammelt, werden die Zellpellets aufgetaut, in $450\ \mu\text{l}$ Reaktionsmix resuspendiert und für 5 min bei 37°C vorinkubiert. Der Start der Transferase-Reaktion erfolgt durch die Zugabe von $50\ \mu\text{l}$ $0,2\ \text{M}$ Glutamin pH 7 ($\hat{=}$ $20\ \text{mM}$ Glutamin pH 7). Nach 5 min wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Stopppmix abgestoppt und die Ansätze werden bei 13.000 rpm

für 3 min zentrifugiert. Anschließend wird die Absorption des Überstandes bei 540 nm photometrisch bestimmt. Als Leerkontrolle dient ein Reaktionsansatz, dem keine Glutaminsynthetase zugesetzt wird. Dies wird noch weitere zweimal wiederholt. Von dem übrig gebliebenen Zellpellet wird, wie unter 2.8.1.1 beschrieben, ein Proteinextrakt hergestellt und die Proteinkonzentration (siehe 2.8.2) zur weiteren Berechnung der Enzymaktivität bestimmt. Die Konzentration an γ -Glutamylhydroxamat in den Proben wird nach folgender Formel berechnet (siehe (2.3)):

$$\frac{A_{540}}{(t_{min} \cdot \text{Proteinkonzentration}_{mg/ml})} = \frac{\mu\text{mol} \cdot \text{ml}}{(\text{min} \cdot \text{ml} \cdot \text{mg})} \quad (2.3)$$

Der Extinktionskoeffizient beträgt hierbei 0,533 mmol/ml cm_{Dicke der Küvette (= 1 cm)}

Reaktionsmix:	150	mM	Imidazol
	0,3	mM	MgCl ₂
	20	mM	Natriumarsenat
	0,4	mM	ADP
	20	mM	Hydroxylamin ²
	1	%	CTAB

Stoppmix:	5,5	%	FeCl ₃ · 6 H ₂ O
	2	%	Trichloressigsäure
	2,1	%	HCl

2.11 Säulenchromatographische Methoden

Die Chromatographie findet Verwendung zur Anreicherung und Trennung löslicher Stoffe für analytische und präparative Zwecke. Anhand der Wahl des Trennprinzips wird zwischen Affinitäts-, Adsorptions- und Ionenaustauschchromatographie unterschieden.

2.11.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der Eigenschaft von biologischen Makromolekülen, spezifisch und reversibel an andere Substanzen (Liganden) zu binden. Sie dient zur Trennung von Proteinen aufgrund spezifischer Bindungseigenschaften.

2.11.1.1 Heparinsäule

Die Heparinsäule dient zur Aufreinigung von DNA-bindenden Proteinen. Als funktionelle Gruppe der Säulenmatrix wird hierbei Heparin verwendet, welches DNA-bindende Proteine bindet und somit eine Aufreinigung dieser ermöglicht.

²Da Hydroxylamin bei einem pH-Wert von 7 instabil ist, wird es unmittelbar vor Gebrauch aus gleichen Teilen 1,6 M Hydroxylammoniumchlorid und 1,6 M NaOH hergestellt. Der pH-Wert des Gemisches beträgt sieben.

Die Aufreinigung DNA-bindender Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit an der *BioLogic Workstation* (Bio-Rad) bei 4 °C unter Verwendung von Heparin-Sepharose (*Econo-Pac® heparin cartridge* (Bio-Rad)) durchgeführt. Die Fraktionen wurden durch den Fraktionskollektor *Model 2/28* (Bio-Rad) gesammelt. Anhand des *BioLogic Controllers* (Bio-Rad) wurden gemessene Daten, wie z. B. Absorption des Durchlaufes bei einer Wellenlänge von 280 nm oder Elutionsprofile, gesammelt und über das Computerprogramm *BioLogic HR Chromatography System* (Bio-Rad) verwaltet.

Die in dieser Arbeit verwendete Heparinsäule (Volumen: 5 ml; Bindekapazität: 50 *units*/ml) wurde nach den Angaben des Herstellers (Bio-Rad) installiert, mit ddH₂O gespült und mit Puffer A äquilibriert. Die zu untersuchenden Proteinproben werden nach Zellaufschluss (siehe 2.8.1.2) durch Ultrazentrifugation bei 58.000 rpm und 4 °C für 1 h von Zellresten und Membranproteinen befreit. Nach der Ultrazentrifugation werden die Proteinextrakte unter Verwendung von Puffer A auf identische Proteinkonzentrationen eingestellt und auf die Säule aufgetragen. Der Probeneinlauf erfolgt mit einer Flussrate von 0,5 ml min⁻¹. Nach dem Waschen der Säule mit Puffer A bei einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ werden die gebundenen Proteinen mit Puffer B von der Säule eluiert. Der für die Elution angelegte Gradient verlief von 0 bis 2 M NaCl in Puffer B. Das Fraktionsvolumen beträgt 1 ml.

Die aufgelisteten Puffer sowie das ddH₂O für die Heparinsäule werden unter Vakuum entgast.

Puffer A:	50	mM	Natriumphosphat, pH 6,8
	1	mM	Benzamidin

Puffer B:	50	mM	Na ₃ PO ₄ , pH 6,8
	1	mM	Benzamidin
	2	M	NaCl

2.12 Geräte, Chemikalien und Enzyme

2.12.1 Spezielle Artikel und Geräte

3 mm und 6 mm Whatman-Papier, Whatman
BioLogic Workstation (Chromatographieanlage), Bio-Rad
Blot-Apparatur, Keutz
Dialyseschläuche, Roth
Digitalkamera, Nikon Coolpix 995
Elektrophoresegelelammern, BioRad
Elektroporation *E. coli* Pulser, BioRad
Elektroporation Gene Pulser II + Pulse controller plus, BioRad
Elektroporationsküvetten 0,2 cm, BioRad; Peqlab
Elektroporationsküvetten 0,1 cm, Peqlab
Gene Amp PCR System 2400, Perkin-Elmer
Glasperlen 0,1-0,11 mm Ø, B. Braun Biotech International GmbH
Imaging-Platte für den Molecular Imager®FX, Fuji
Klettmetre, Summerson
Kühlzentrifuge RC-5B, Sorvall
Kühlzentrifuge RC-5C Plus, Sorvall
Mikroskop, Nikon Eclipse E200
Molecular Imager®FX, Fuji
Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher u. Schuell, BioScience
pH-Meter cG820, Schott Geräte
Photometerkolben/Seitenarmkolben, Ochs
ProbeQuant G- 50 Micro Columns, Amersham Pharmacia
PVDF-Membran 0,45 µm, Roche
Reinstwasseranlage Typ Hp6 UV/UF, TKA
Ribolyser, Hybaid-AGS, Heidelberg
Rotor-Gene 3000 real time PCR cyclers, Corbett Research
Spektralphotometer (Ultraspec 3000pro), Pharmacia Biotech
Stereoskop, Nikon SMZ800
Szintillationszähler, Beckmann Coulter
Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus Sepatech
Ultrazentrifuge OptimaTM TLX Ultrazentrifuge, Beckman Coulter
Ultraschallgerät Sonoplus GM70 (Sonifier), Bandelin
UV-Crosslinker-Apparatur (UV-Stratalinker 1800), Stratagene
Vakuumbzentrifuge (Speed-Vac-Concentrator), Savant
Videodokumentationsanlage für Gele, Herolab
Zählkammer, Thoma

2.12.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid, Roth
Agarose, FMC, Rockland
Anhydrotetrazyklin (AHT), IBA GmbH Ammoniumpersulfat (APS), Aldrich
Bacto Agar, Difco
Benzamidin, Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA), Sigma
Bradford-Reagenz, Roti-Quant, Roth
Bromphenolblau, Merck
Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid (CTAB), Roth
Dimethyl-Formamid (DMF), Dimethyl-Sulfoxid (DMSO), Sigma
Dithiothreitol (DTT), Roth
Glycin, Roth
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG), Roth
Hefeextrakt, Gibco
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS), Roth
Pepton, Marcor M Pfu-Polymerase, Fermentas
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma
Probion, Hoechst AG Frankfurt
Standardchemikalien, Roth
Taq-Polymerase, Fermentas

2.13 Molekularbiologische Kits

QIAquick PCR purification Kit, Qiagen
E.Z.N.A[®] High Plasmid Miniprep Kit II, Peqlab
Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche
TOPO[®] XL PCR Cloning Kit, Invitrogen
Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit, Invitrogen
QIAGEN[®] OneStep RT-PCR Kit

2.14 Größenstandards DNA/Proteine

GeneRulerTM 1kb DNA ladder, ready-to-use, MBI, Fermentas
Prestained Protein Molecular Weight Marker, MBI, Fermentas

2.15 Enzyme

Die Enzyme stammten von folgenden Firmen:

MBI, Fermentas

Restriktionsendonukleasen; Klenow-Fragment; T4-DNA-Ligase; T4-Polynukleotid-Kinase; Exonuklease III; S1-Nuklease; Alkalische Phosphatase aus Kälbern (CIAP); DNase; RNase

Qiagen

Proteinkinase K (20 mg/ml)

USB

snake venom Phosphodiesterase

2.16 Antikörper

1. Antikörper:

(anti-GlnB *E. coli* IgG Konjugat) Maheswaran & Forchhammer (2003)

2. Antikörper:

(anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat) BioRad

StrepTactin HRP Konjugat IBA, Göttingen

2.17 Verwendete Software

Biology WorkBench 3.2; <http://workbench.sdsc.edu>;

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Daten- und Methodenzentrum)

GenDB (Datenbank des Genoms von *S. cellulosum* So ce56)

Custom Blast (= TBLASTN 2.2.9)

PubMed; (www.pubmed.gov)

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Differenzierung

Sorangium cellulosum zeichnet sich als Myxobakterium durch Eigenschaften von sowohl einzelnen als auch mehrzelligen Organismen aus. Auf Grund seiner Fähigkeit zur morphologischen Differenzierung als auch zur physiologischen Differenzierung stellt *S. cellulosum* einen interessanten Modellorganismus dar.

Der Stamm *S. cellulosum* So ce56 (So ce56) wurde 1985 von der GBF aus einer indonesischen Bodenprobe isoliert und besitzt mit einer Größe von 13,0 Mbp (71,83% GC) das größte bekannte bakterielle Genom. So ce56 gehört zur Familie der Polyangiaceae, Gattung *Sorangium* und zeichnet sich durch die Besonderheit der morphologischen wie auch physiologischen Differenzierung aus. Aus diesem Grund wurde das Genom von So ce56 im Rahmen eines Genomprojektes (Start 2001) sequenziert und annotiert.

Neben der morphologischen Differenzierung zeichnet sich So ce56 auch durch die Produktion der Sekundärmetabolite Chivosazol A und Etnangien aus (siehe Abb. 1.4). Beide Sekundärmetabolite sind Polyketide und gehören damit zu der großen Familie an biologisch wirksamen Substanzen, die in Bakterien, Pilzen sowie Pflanzen gefunden wurden. Chivosazol ist zytotoxisch und gegen Pilze einsetzbar, während Etnangien seine Wirkung gegen Gram-positive Bakterien sowie Pflanzenschädlinge entfaltet. Da von Streptomyceten bekannt war, dass die Bildung von Sekundärmetaboliten mit der morphologischen Differenzierung der Streptomyceten einhergeht (Bibb 2005), sollte in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen morphologischer und physiologischer Differenzierung in *S. cellulosum* So ce56 (So ce56) näher untersucht werden.

Als erstes Ziel galt es, ein geeignetes Nährstoffmangelmedium für *S. cellulosum* zu etablieren. Weitere Studien sollten Erkenntnisse über die an der morphologischen Differenzierung beteiligten Gene bzw. Genprodukte liefern.

3.1.1 Entwicklung eines Differenzierungsmediums für *S. cellulosum*

Ein geeignetes Differenzierungsmedium für So ce56 sollte es ermöglichen, unter Laborbedingungen eine schnelle und reproduzierbare Differenzierung von So ce56 beobachten zu können. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde das synthetische Medium S (siehe 2.2.1.7) in leicht abgewandelter Form als Differenzierungsmedium für So ce56 eingesetzt. Dies führte jedoch selten zu reproduzierbaren Ergebnissen und setzte in der Regel Vorkulturen in S-Medium voraus. Ein schnelles Wachstum von So ce56 konnte bisher jedoch nur in den beiden Komplexmedien M-Medium und P-Medium erreicht werden.

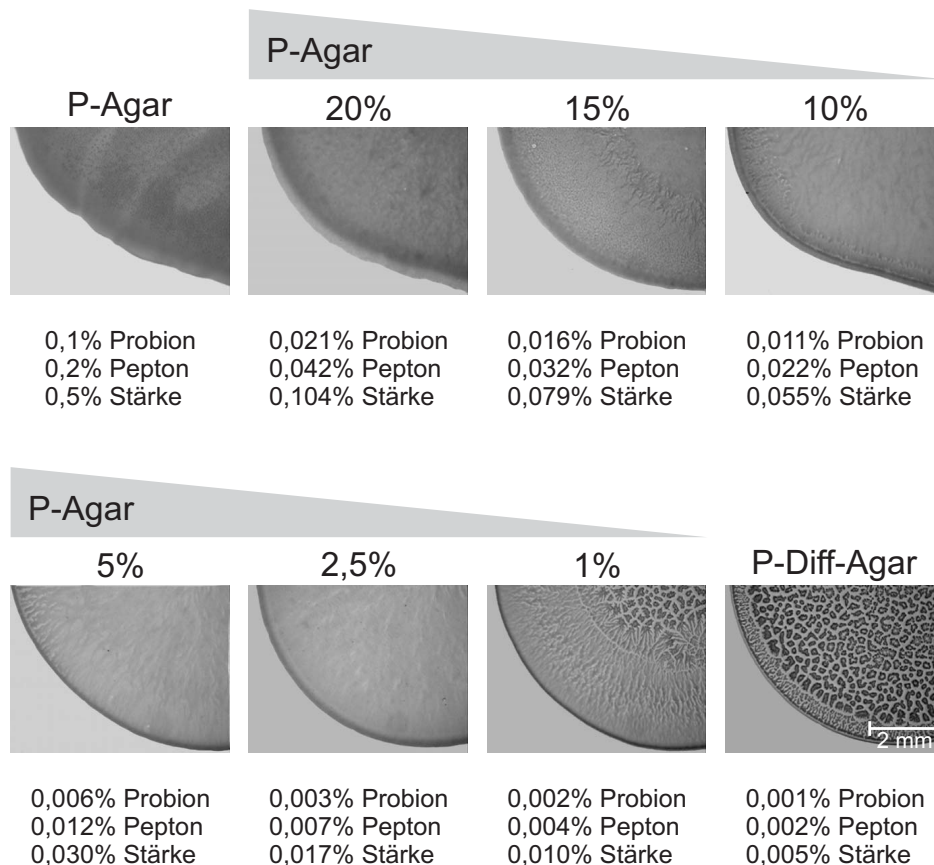


Abbildung 3.1: Differenzierungsassay mit unterschiedlichen Verhältnissen von P-Agar zu P-Diff-Agar. Die Prozentangaben über den jeweiligen Abbildungen geben die % P-Agar im Verhältnis zu P-Diff-Agar an. Die Prozentangaben unter den jeweiligen Abbildungen geben die genaue Menge in % an Probion, Pepton und Stärke in dem jeweiligen Ansatz an. Es wurden je 50 μ l Zellsuspension aufgetropft.

Wie vorher bereits erwähnt, wird die Zelldifferenzierung durch verschiedene Faktoren begünstigt. Ein wichtiger Faktor für die Differenzierung des bakteriolytischen Myxobakteriums *M. xanthus* ist das Angebot an Nährstoffen. Werden diese reduziert, so beginnt *M. xanthus* mit der Zelldifferenzierung, welche in der Ausbildung von mit Sporen gefüllten Fruchtkörpern endet.

Anhand dessen wurde für die Etablierung eines geeigneten Differenzierungsmediums für So ce56 zunächst ein Medium angesetzt, in welchem die Nährstoffe drastisch reduziert vorlagen. Dieses Medium, basierend auf dem Komplexmedium P (siehe 2.2.1.5), enthält nur 1 % der Nährstoffe und wurde als P-Diff-Medium bezeichnet. Um die Differenzierung auf fester Oberfläche beobachten zu können, wurde beiden Medien für die weiteren Versuche 1,5 % Agar zugesetzt.

Ausgehend von diesen beiden Medien, dem Komplexmedium P und dem P-Diff-Medium, wurden verschiedene Testreihen angesetzt, um die Bedingungen für die morphologische Differenzierung von So ce56 näher zu definieren. Exemplarisch für einen Versuch sei hier die stufenweise Reduzierung der Nährstoffe, ausgehend von dem Komplexmedium P gezeigt (siehe Abb. 3.1). Dies wurde durch Mischen der beiden Agar in definierten Verhältnissen (1 %, 2,5 %, ..., 20 % P-Medium) erreicht.

Für diesen Differenzierungsversuch wurden Zellen von So ce56 in M-Medium (siehe 2.2.1.3)

bis Erreichen einer OD_{600} von 4 angezogen und wie unter 2.2.4.1 beschrieben weiter behandelt. In Abbildung 3.1 ist das Ergebnis des Differenzierungsassays gezeigt. Deutlich erkennbar ist die vollständige Differenzierung von So ce56 auf P-Diff-Agar nach vier Tagen Inkubation. Somit wurde P-Diff als Differenzierungsagar weiter verwendet.

3.1.2 Vorbehandlung der Zellen für den Differenzierungsassay

Neben dem Austesten eines für die Differenzierung geeigneten Differenzierungsmediums war es wichtig, festzustellen, wie die Zellen vor dem eigentlichen Differenzierungsassay zu behandeln sind. Als Ausgangsmedium für die Differenzierung wurde das Komplexmedium P verwendet, welches bis zu diesem Zeitpunkt als Wachstumsmedium eingesetzt wurde. Da dieses Medium durch seinen Bestandteil Stärke und Probion trübe ist, eignet es sich leider nicht sehr gut zur Anzucht von *S. cellulorum* in Flüssigkultur. Zum einen können Kontaminationen in einem trüben Medium schlechter identifiziert werden, zum anderen wird die Bestimmung der optischen Dichte erschwert. Deswegen fiel die Wahl für die Anzucht und für die Vorbehandlung der Zellen auf das Komplexmedium M. Dieses eignet sich gut zur Anzucht von *S. cellulorum* und ist im Gegensatz zu P-Medium nicht trüb.

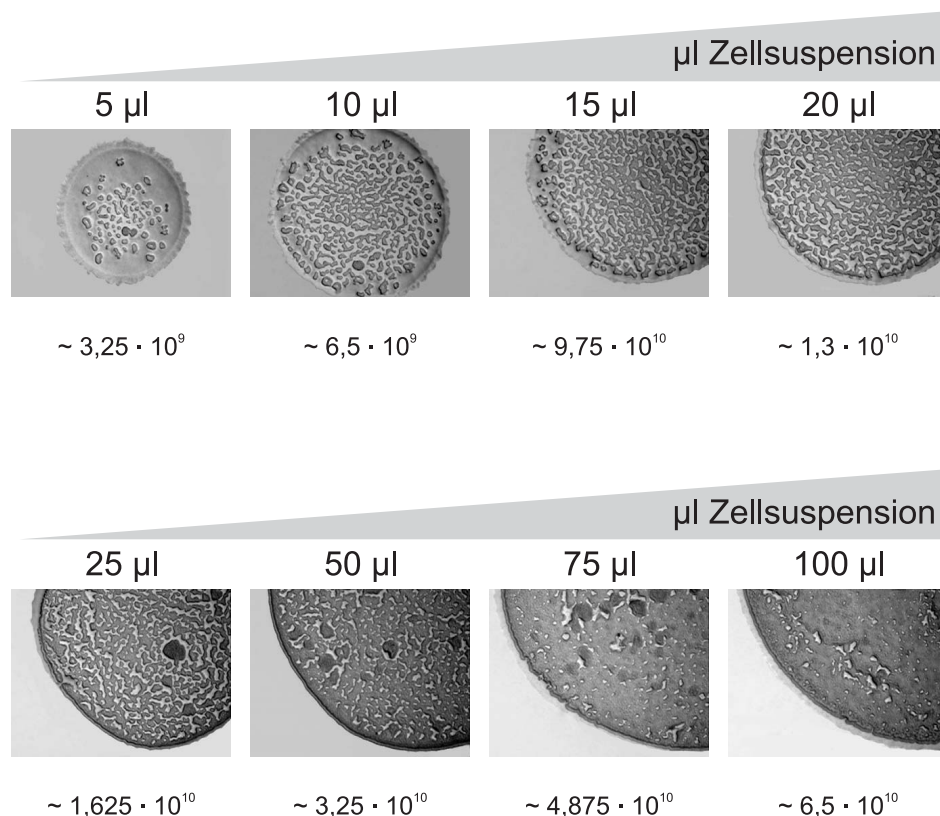


Abbildung 3.2: Differenzierungsassay auf P-Diff-Agar unter Verwendung von unterschiedlichen Mengen an aufkonzentrierter Zellsuspension von So ce56. Die Abbildungen zeigen den unterschiedlichen Grad der Differenzierung in Abhängigkeit der Menge an aufgetropfter Zellsuspension. Die Zahlen unter der jeweiligen Abbildung geben die Zellzahlen der aufgetropften Zellsuspension an.

Von dem Differenzierungsassay von *M. xanthus* war bekannt, dass die Zellen für eine erfolgreiche Differenzierung zunächst bis zum Erreichen der exponentiellen Phase angezogen und noch vor dem Auftropfen auf Differenzierungsagar auf Nährstoffmangelbedingungen eingestellt werden. Dies wurde durch zweimaliges Waschen in Differenzierungsmedium gewährleistet. Des Weiteren war bekannt, dass *M. xanthus* auf eine bestimmte Zelldichte aufkonzentriert werden muss, um eine erfolgreiche Differenzierung zu durchlaufen. Anhand dieser Erkenntnisse wurden verschiedene Ansätze des Differenzierungsassays von *S. cellulorum* gestartet. Zunächst wurden die Zellen von So ce56 bis Erreichen der exponentiellen Phase (OD_{600} von 4) unter Schütteln bei 32 °C inkubiert, abzentrifugiert und in Differenzierungsmedium P-Diff einmal gewaschen. Dabei stellte sich heraus, dass durch das Waschen in Differenzierungsmedium den Zellen so viele Nährstoffe entzogen wurden, dass ein Überleben nicht mehr gewährleistet war und die Zellen lysierten. Um trotzdem etwaige anfallende Stoffwechselprodukte aus dem Medium zu entfernen, wurde stattdessen ein Waschschriff mit dem Komplexmedium M eingeführt. Nach diesem Waschschriff und nachfolgender sechsfacher Aufkonzentrierung der Zellen wurden zunächst verschiedene Mengen an Zellsuspension auf den vorbereiteten P-Diff-Agar aufgetropft (siehe 2.2.4.1). Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen ist, waren 25 bis 50 μ l der Zellsuspension ausreichend für die Differenzierung von So ce56, wohingegen Mengen unter 25 μ l und über 50 μ l zu keiner vollständigen Differenzierung führten.

Die verschiedenen Phasen der Differenzierung von So ce56

In Abbildung 3.3 ist der zeitliche Verlauf der Differenzierung von So ce56 auf P-Diff-Agar abgebildet. Die Differenzierung konnte anhand spektroskopischer Untersuchungen in vier sowohl zeitlich als auch morphologisch unterschiedliche Phasen eingeteilt werden.

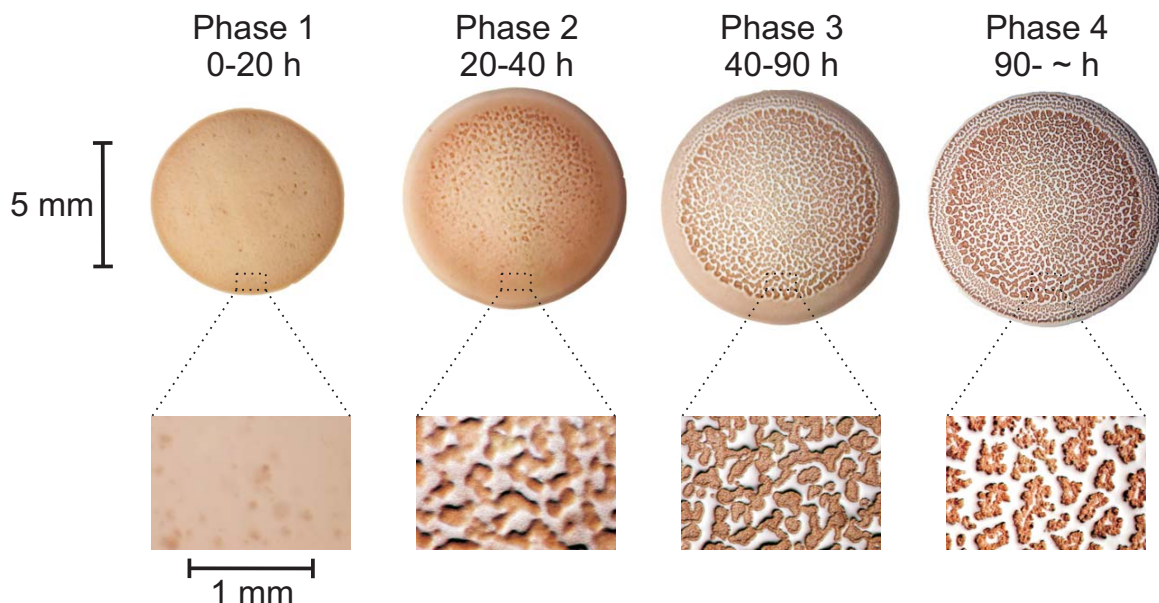


Abbildung 3.3: Zeitlicher Verlauf der Differenzierung von So ce56 auf P-Diff-Agar. Die Differenzierung von So ce56 wurde in vier verschiedene Phasen eingeteilt: 1. Phase: vegetatives Stadium; 2. Phase: Aggregation der Zellen; 3. Phase: frühe Phase der Fruchtkörperbildung (FK); 4. Phase: späte Phase der FK-Bildung.

- **Phase 1:** Die erste Phase der Differenzierung kennzeichnet die Zeit, in der sich die Morphologie der Zellen nicht ändert. Diese Phase dauert etwa 20 h. Bei genauerer Betrachtung unter dem Mikroskop können in dieser Phase nur vegetative Stäbchen beobachtet werden.
- **Phase 2:** In Phase 2 beginnen die Zellen langsam zu aggregieren. Diese Phase zieht sich ebenfalls über eine Zeitspanne von etwa 20 h hin.
- **Phase 3:** Während der dritten Phase können die ersten Fruchtkörper beobachtet werden, die jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgebildet sind, da noch keine Sporangien sichtbar werden (frühe Phase der Fruchtkörperbildung).
- **Phase 4:** In Phase 4 ist die Differenzierung schließlich vollständig. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen, können in dieser Phase der Differenzierung, Sporangien im Fruchtkörper beobachtet werden (späte Phase der Fruchtkörperbildung).

Die Fruchtkörper der Gattung *Sorangium* unterscheiden sich morphologisch von anderen Gattungen, wie z. B. *Chondromyces* oder *Stigmatella*. Sind die Fruchtkörper von *Chondromyces* und *Stigmatella* als erhabene Strukturen mit Stielen zu beobachten, so kann man die Fruchtkörper der Gattung *Sorangium* als in die Oberfläche des jeweiligen Substrats eingebettet bezeichnen (Reichenbach & Dworkin 1991). Die Differenzierung dieses Myxobakteriums verläuft sozusagen nicht in die Höhe, sondern flächig auf der Oberfläche oder in diese hinein (siehe Abb. 3.3). Dadurch liegen die Fruchtkörper auch dicht beieinander und sind gegeneinander nicht sehr stark abgegrenzt. Die Fruchtkörper von So ce56 bestehen jeweils aus einer Masse von Sporangien.

Nach den oben beschriebenen Versuchen konnte der Differenzierungsassay (siehe 2.2.4.1) für So ce56 etabliert werden. Mit diesem ist es nun möglich, die Differenzierung von So ce56 reproduzierbar einzuleiten. Des Weiteren wurden in diesem Rahmen ein weiteres Differenzierungsmedium (M-Diff-Medium) etabliert, welches es ermöglicht, So ce56 in Flüssigkultur unter Differenzierungsbedingungen zu inkubieren. Auch dieses Medium besitzt nur 1 % der im Ausgangsmedium M enthaltenen Nährstoffe. Das M-Diff-Medium erlaubte es, Proben von So ce56 aus Flüssigkulturen unter Differenzierungsbedingungen zu untersuchen. Der Vorteil dieses Mediums liegt dabei in der Zusammensetzung (siehe 2.2.1.4). Im Gegensatz zu dem P-Medium bzw. dem P-Diff-Medium wird das M-Medium bzw. das M-Diff-Medium nicht durch Medienbestandteile getrübt, wodurch Kontaminationen eher vermieden werden können und die Messung der optischen Dichte vereinfacht wird.

3.2 Einfluss von *asgA* auf die Differenzierung in *S. cellulorum* So ce56

Der komplexe Entwicklungszyklus von *M. xanthus* wird durch Nährstoffmangel induziert und durch Austausch von diffusiblen Signalsubstanzen und einem direkten Zell-Zell-Kontakt gefördert. Des Weiteren beinhaltet die Differenzierung von *M. xanthus* ein stark geordnetes System der Genexpression, welches durch den direkten Zell-Zell-Kontakt gesteuert wird. Für die normale

Entwicklung von *M. xanthus* konnten anhand von Komplementationsversuchen fünf Signale, A-, B-, C-, D- und E-Signal, identifiziert werden, von denen jedoch nur zwei (A-Signal und C-Signal) funktionell und biochemisch verifiziert werden konnten (Kaiser 2004). Zeitlich gesehen werden die Gene (*asgA-E*) für das A-Signal früh in der Entwicklung exprimiert, wobei Mutationen in den *asg*-Genen zu Aggregation- und Sporulationsdefekten führen und sich des Weiteren in einer verminderten A-Faktor-Produktion äußern (Kaiser 2004).

Anhand der Genomähnlichkeit von *S. cellulorum* und *M. xanthus* wurde vermutet, dass ähnliche Signale bzw. Gene wie in *M. xanthus* für die Differenzierung von *S. cellulorum* zuständig sind.

3.2.1 Potenzielle *asgA* kodierende Gene in *S. cellulorum* So ce56

Wie zuvor schon erwähnt, werden die *asg*-Gene früh in der Differenzierung von *M. xanthus* exprimiert und sind somit mit für die Einleitung des Differenzierungsprogrammes verantwortlich. Von den fünf verschiedenen *asg*-Genen in *M. xanthus* kodieren zwei Gene, *asgA* und *asgD*, je ein Protein mit einer N-terminalen *receiver*-Domäne gefolgt von einer C-terminalen Histidinkinase-Domäne (Plamann et al. 1995). Für AsgA konnte eine Autokinase- und Autophosphorylierungsaktivität nachgewiesen werden (Li & Plamann 1996).

Der ungewöhnliche Aufbau (N-terminale *receiver*-Domäne und C-terminale Histidinkinase) und die Tatsache, dass diese Proteine zum Teil stark konserviert sind, ließ hoffen, dass *asgA/D*-homologe Gene in dem Genom von So ce56 zu finden sind.

Durch einen Vergleich der *asgA*- und *asgD*-Sequenzen von *M. xanthus* mit dem Genom von So ce56 konnten mehrere *asgA/D*-homologe Gene identifiziert werden, deren Genprodukt eine mehr oder weniger große Homologie zu AsgA bzw. AsgD von *M. xanthus* aufwiesen (siehe Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Homologien der möglichen AsgA/D-homologen Proteine aus *S. cellulorum* im Vergleich zu AsgA und AsgD von *M. xanthus*. Der Wert des *e-values* drückt aus, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Ähnlichkeit der gesuchten Sequenz mit der gefundenen Sequenz rein zufällig ist. Je näher bei Null bzw. je kleiner dieser Wert ist, desto signifikanter ist die Übereinstimmung der verglichenen Sequenzen. Abkürzung aa = *amino acids*.

AsgA/D-homologe Proteine aus So ce56	Länge	<i>e-value</i>	Identität zu AsgA aus <i>M. xanthus</i> (385 aa)	<i>e-value</i>	Identität zu AsgD aus <i>M. xanthus</i> (773 aa)
Sce4026	396 aa	4e-31	25,8%	2e-23	33%
Sce1742	549 aa	2e-32	18,6%	4,3	24%
Sce1173	549 aa	3e-34	15,3%	0,001	23%
Sce0723	636 aa	2e-34	13,8%	8e-15	29%
Sce0817	859 aa	5e-30	10,9%	9e-19	28%

Das Genprodukt von *sce4026* zeigte mit einer Identität von 25,3 % die größte Homologie zu AsgA von *M. xanthus* und gleichzeitig mit 33 % Identität ebenfalls die größte Homologie zu AsgD von *M. xanthus* (siehe Tabelle 3.1). Die große Homologie des Genprodukts von *sce4026* lässt sich ebenfalls in einer phylogenetischen Analyse verdeutlichen (siehe Abb. 3.4). Zwei der Proteine aus dem Genom von So ce56 wiesen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu AsgA aus *M. xanthus* auf. Das Protein Sce0817 zeigte dagegen bei dem Vergleich der Homologien mit 10,9 % Identität die niedrigste Übereinstimmung. Ausschlaggebend für die Auswahl des zu untersuchenden Gens bzw. Proteins von So ce56 waren letztendlich die Identität zu AsgA/D von *M. xanthus* wie auch die Domänenstruktur des Proteins. Im Folgenden wird dieses Protein (Sce4026) von So ce56 dementsprechend als AsgA bezeichnet bzw. das Gen entsprechend *asgA*.

Die Untersuchung der im Protein enthaltenen Domänen ergab, dass es sich in allen drei Fällen (AsgA_{Soce56}, AsgA_{M.xanthus} und AsgD_{M.xanthus}) um ein Zwei-Komponenten-ähnliches Signaltransduktionssystem handelt, aufgebaut aus einer N-terminalen *receiver*-Domäne und einer C-terminalen Histidinkinase. Jedoch wurde im AsgA-Protein von So ce56 wie auch in dem AsgA-Protein von *M. xanthus* keine Zwischensequenz zwischen den beiden Domänen gefunden, wie für AsgD bekannt. Das kalkulierte Molekulargewicht für AsgA_{So ce56} ergab 43,4 kDa, vergleichbar mit dem kalkulierten Molekulargewicht von AsgA_{M.xanthus} mit 42,1 kDa (*SDSC Biology workbench 3.2* (<http://workbench.sdsc.edu>)).

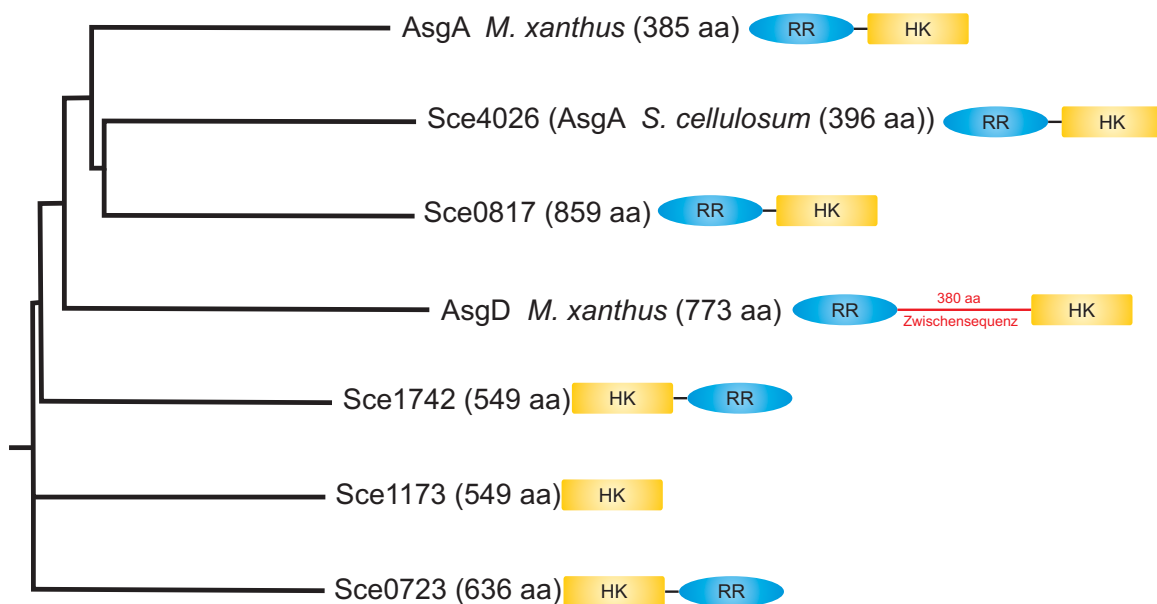


Abbildung 3.4: Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen von AsgA und AsgD von *M. xanthus* und fünf AsgA/D-homologen Proteinen aus *S. cellulorum* basierend auf einer *ClustalW*-Analyse (*SDSC Biology workbench 3.2* (Higgins et al. 1992, Thompson et al. 1994)). Sce4026 und Sce0817 von So ce56 weisen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu AsgA von *M. xanthus* auf.

3.2.1.1 Die *asgA/D*-Regionen im Genom von *S. cellulorum* und *M. xanthus*

Die genetische Organisation der drei Gene wird in Abbildung 3.5 verdeutlicht. Sie weisen keinerlei vergleichbare genetische Organisation untereinander auf.

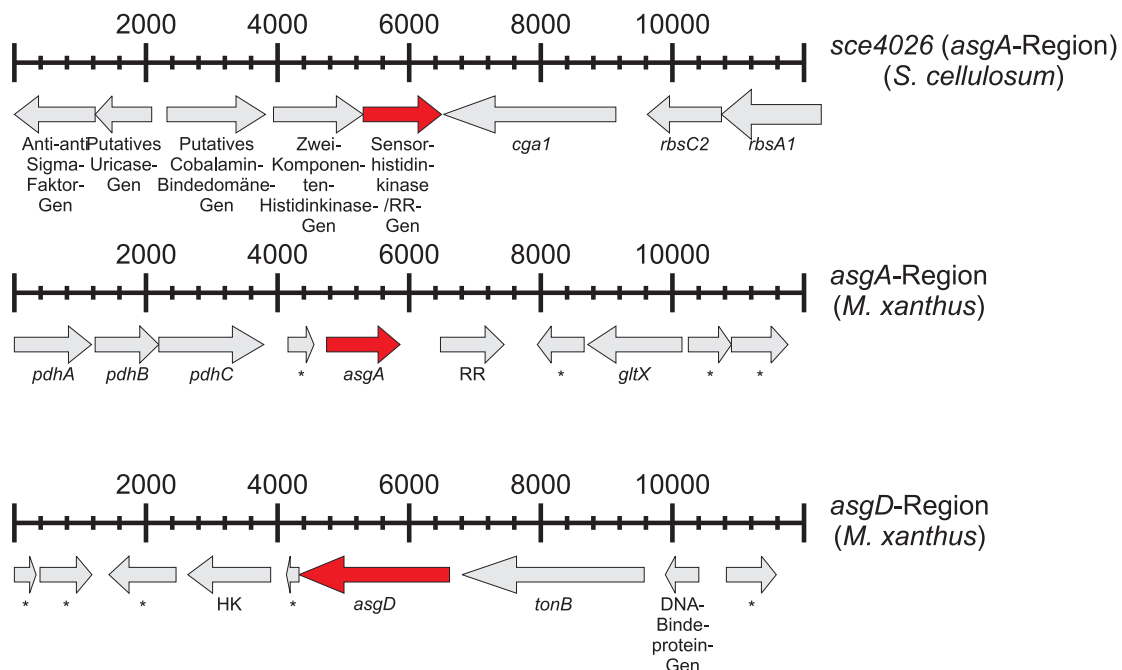


Abbildung 3.5: Genetische Organisation der *asgA/D*-Region von *So ce56* und *M. xanthus*. Die Bezeichnung und Zuordnung der Gene wurde direkt aus beiden Genomen übertragen. Das *asgA*- bzw. das *asgD*-Gen sind rot dargestellt. Die Genregionen sind maßstabsgetreu dargestellt.

3.2.2 Konstruktion der *S. cellulorum* So ce56 *asgA*- Mutante

Um mehr Hinweise über die Funktion des *asgA*-Gens in *So ce56* zu erhalten, wurde im weiteren Verlauf eine Insertionsmutante des *asgA*-Gens durch homologe Rekombination in *So ce56* konstruiert.

3.2.2.1 Klonierung des Konjugationsplasmids pSUPHyg *asgA* und Konjugation nach *S. cellulorum* So ce56

Zur Konstruktion einer *asgA*-Insertionsmutante in *So ce56* wurde zunächst ein 870 bp großes internes Fragment des *asgA*-Gens unter Verwendung der primer *asgAint+* und *asgAint-* mittels *FailSafeTM* PCR (siehe 2.6) mit chromosomaler DNA von *So ce56* amplifiziert. Die PCR verlief unter Standardbedingungen. Zur präparativen Aufreinigung des PCR-Amplifikats wurde dieses aus einem 1 %igen Agarosegel extrahiert (siehe 2.4.7.1). Das Produkt wurde mittels des Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR[®]-XL-TOPO[®] kloniert. Nach der Klonierung des PCR-Produktes in den pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor wurde dieser in

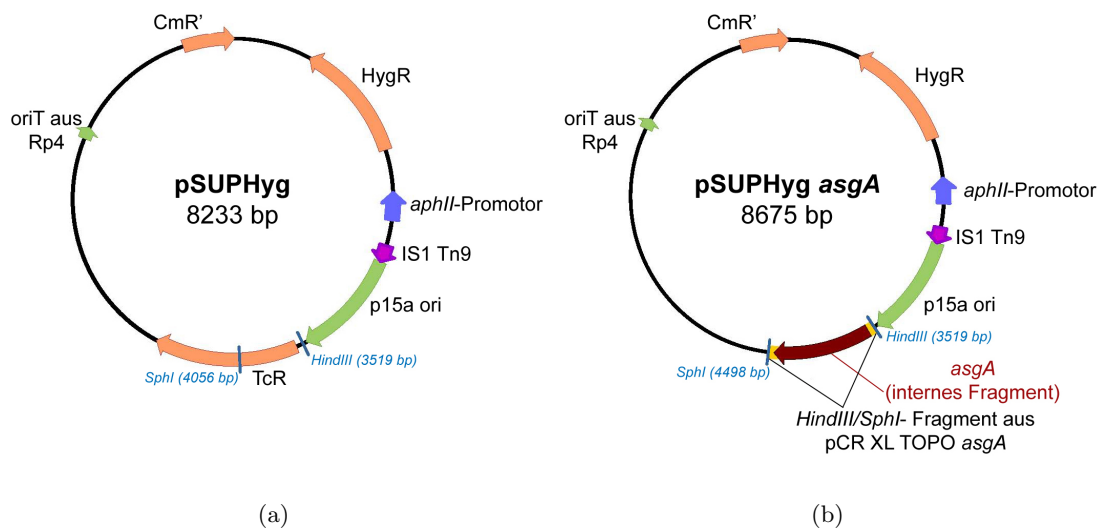


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Konjugationsvektoren (a) pSUPHyg (Ausgangsvektor) und (b) pSUPHyg *asgA* (Endkonstrukt). Die Schnittstellen HindIII und SphI sind bei der Klonierung von pSUPHyg *asgA* erhalten geblieben. Das HindIII/SphI-Fragment aus pCR XL TOPO *asgA* bezeichnet den Bereich, der aus dem pCR[®]-XL-TOPO[®] *asgA*-Vektor in pSUPHyg kloniert wurde. Die Graphiken wurden mit der Software Vector NTI generiert. TcR = Tetrazyklinresistenzgen; HygR = Hygromycinresistenzgen unter der Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes (*aphII*-Promotor); CmR' = zerstörtes Chloramphenicolresistenzgen.

E. coli Top10 vermehrt. Die potenziellen Klone wurden mit Hilfe von PCR und verschiedenen Restriktionen überprüft.

Über die Schnittstellen HindIII und SphI wurde das über ein Agarosegel extrahierte Fragment in die entsprechenden dephosphorylierten Schnittstellen des Konjugationsvektors pSUPHyg kloniert. In Abbildung 3.6(b) ist das daraus resultierende Plasmid pSUPHyg *asgA* graphisch dargestellt. Die erhaltenen Klone wurden ebenfalls per PCR und verschiedener Restriktionsverdaus überprüft.

Das konstruierte Plasmid pSUPHyg *asgA* wurde in den *E. coli* Stamm ET12567 pUB307 (*tra*⁺) transformiert und nach *S. cellulorum* konjugiert (siehe 2.3.2). Die potenziellen *asgA*-Mutanten wurden zunächst auf Wachstum in Komplexmedium überprüft. Für die weitere Überprüfung

Tabelle 3.2: *primer*-Kombinationen mit den erwarteten Fragmentgrößen zur Überprüfung der potenziellen *asgA*-Mutanten

<i>primer</i> -Kombinationen	erwartete Fragmentgröße
<i>asgA</i> int+/pSUPHygSphI	966 bp in <i>SasgA</i>
pSUPHind+/ <i>asgA</i> int-	998 bp in <i>SasgA</i>
<i>asgA</i> int+/ <i>asgA</i> int-	870 bp in <i>SasgA</i> und pSUPHyg <i>asgA</i>
<i>asgA</i> start/ <i>asgA</i> stop	1191 bp im Wildtyp
hygint+2/hygint-2	532 bp in <i>SasgA</i> und pSUPHyg <i>asgA</i>

der potenziellen *asgA*-Mutanten wurde die chromosomale DNA isoliert und verschiedene PCRs durchgeführt. Die verwendeten Kombinationen von *primern*, sowie die daraus resultierenden Fragmentgrößen sind der Tabelle 3.2 und Abbildung 3.7(b) zu entnehmen. Abbildung 3.7(a) veranschaulicht graphisch die homologe Rekombination von pSUPHyg *asgA* in das Chromosom von So ce56.

Die Integration von pSUPHyg *asgA* in das Chromosom von *S. celluloseum* führte zu einer Unterbrechung des Gens mit der Folge, dass für ein vollständig kodierte Protein nur 42 Aminosäuren vom C-terminalen Ende fehlen. Diese Region wurde in AsgA/D von *M. xanthus* als äußerst

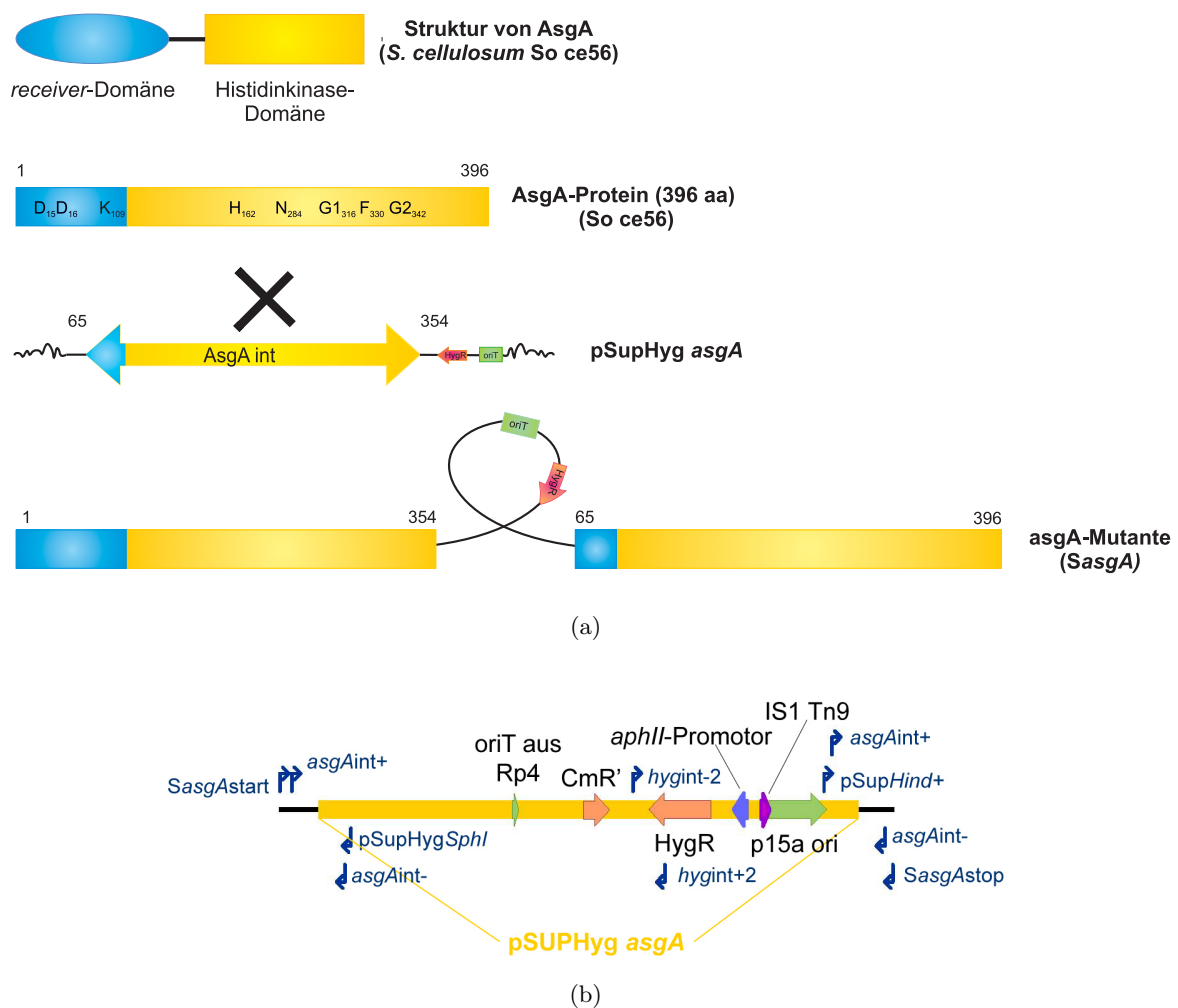


Abbildung 3.7: Konstruktion der *SasgA*-Mutante durch homologe Rekombination von pSUPHyg *asgA* in das Chromosom von So ce56. (a) Für die Konstruktion der *asgA*-Mutante in So ce56 wurde ein internes Fragment von *asgA* in den Konjugationsvektor pSUPHyg kloniert. Der Vektor pSUPHyg *asgA* wurde durch ein „single crossover“-Ereignis in das Genom von So ce56 integriert. Dies hatte zur Folge, dass *asgA* durch die Vektorsequenz (pSUPHyg *asgA*) unterbrochen wurde. Daher fehlen für ein vollständig kodierte Protein 42 aa vom C-terminalen Ende der Histidinkinase-Domäne. (b) Schematische Darstellung des *asgA*-Gens nach erfolgreicher homologer Rekombination von pSUPHyg *asgA* in das Chromosom von So ce56. Für die Test-PCRs verwendete *primer* wurden eingezeichnet. Die Graphik wurde mit der Software Vector NTI generiert. HygR = Hygromycinresistenzgen unter der Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes (*aphII*-Promotor); CmR' = zerstörtes Chloramphenicolresistenzgen.

essentiell angesehen. Im Gegensatz zu der *asgA*-Mutation in So ce56 resultiert die Mutation von *asgA* in *M. xanthus* in einem Aminosäureaustausch in der Nähe der Nukleotid-Binderegion der Histidinkinase-Domäne.

Durch einen Vergleich der verschiedenen PCRs auf den potenziellen *S. cellulorum asgA*-Mutanten, dem Wildtyp und dem Konjugationsplasmid pSUPHyg *asgA* konnte eine Mutante identifiziert werden, bei der eine erfolgreiche homologe Rekombination von pSUPHyg *asgA* in das Chromosom stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Mit dieser Mutante wurde in den folgenden Versuchen weitergearbeitet. Diese Mutante wird im Folgenden als *SasgA* bezeichnet.

3.2.3 Phänotypische Charakterisierung der *asgA*- Mutante von So ce56, *SasgA*

3.2.3.1 Wachstum in Komplexmedium

Um zu testen, inwieweit sich die Mutation im *asgA*-Gen auf das Wachstumsverhalten in Komplexmedium auswirkt, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Dafür wurden die in M-Medium (siehe 2.2.1.3) herangezogenen Kulturen von So ce56 (Wildtyp) und *SasgA* wiederum in M-Medium auf einen Klettwert von 20 überimpft. Das Wachstum wurde solange verfolgt, bis die Kulturen die stationäre Phase erreichten. Der Verlauf des Wachstums wurde in Klett verfolgt.

In Abbildung 3.8 ist der Wachstumsverlauf beider Stämme graphisch dargestellt. Es trat kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wachstum beider Stämme auf. Die Untersuchungen ergaben demnach keinen durch die Mutation im *asgA*-Gen ausgelösten Wachstumsdefekt unter nährstoffreichen Bedingungen. Die Wachstumsversuche wurden zeitlich voneinander getrennt noch mehrmals wiederholt, wobei auch nach mehrmaliger Wiederholung keine Unterschiede beobachtet werden konnten.

Auch Wachstumsversuche in dem synthetischen Medium SM führten zu dem gleichen Ergebnis.

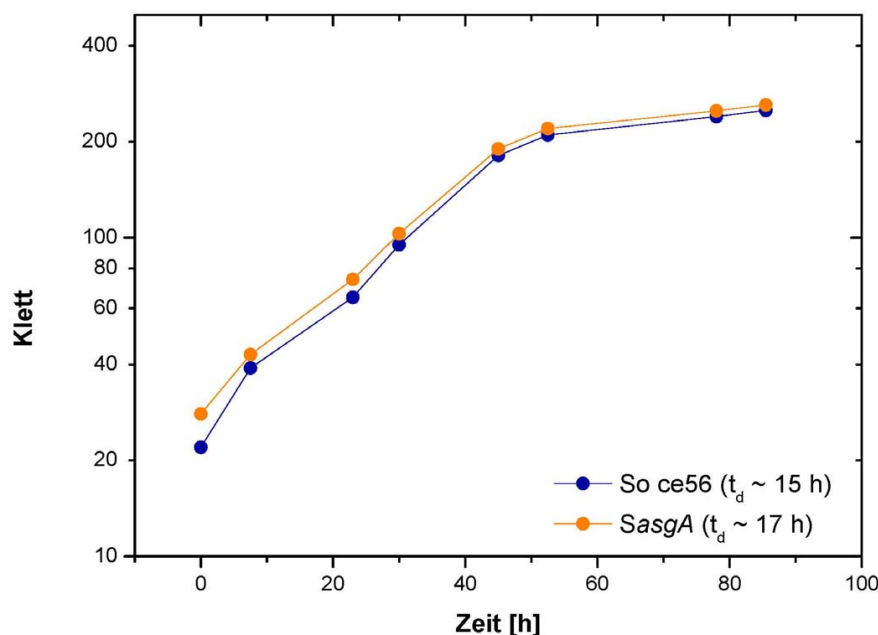


Abbildung 3.8: Wachstum von So ce56 (Wildtyp) und *SasgA* in dem Komplexmedium M. Der Verlauf der Wachstumskurve wurde mit Klettmessungen verfolgt.

3.2.3.2 Morphologische Differenzierung von *SasgA*

Von *M. xanthus* ist bekannt, dass eine Mutation im *asgA*-Gen einen starken Defekt in der morphologischen Differenzierung auslöst (Kuspa & Kaiser 1989). Der Phänotyp der *asgA*-Mutante in *M. xanthus* (DK473) wurde mit einem Defekt in der Aggregationsbildung beschrieben. Das heißt, die Mutanten sind schon sehr früh in der Differenzierung gehemmt und zeigen nur eine sehr schwache Ausbildung von Aggregaten.

Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob *SasgA* einen ähnlichen Defekt in der Differenzierung aufweist. Für die Beantwortung dieser Frage wurde der morphologische Differenzierungsassay, wie unter 2.2.4.1 und 3.1.1 beschrieben, durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

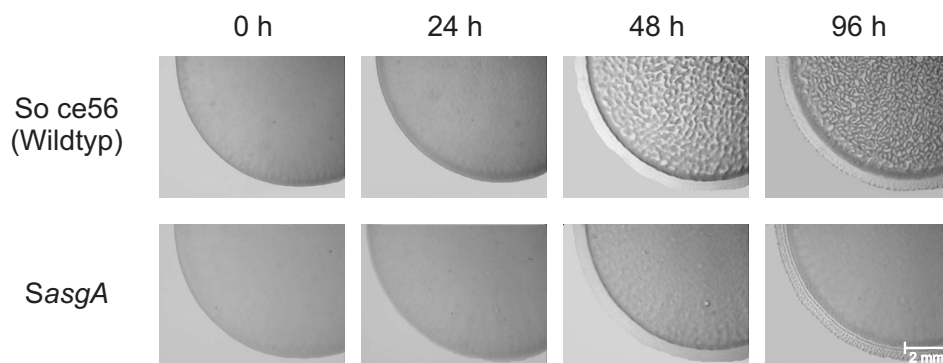


Abbildung 3.9: Phänotyp der morphologischen Differenzierung von *SasgA* im Vergleich zum Wildtyp. Der Differenzierungsassay wurde wie unter 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Die Differenzierung wurde über eine Zeitspanne von 4 Tagen beobachtet.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Differenzierungsassays von So ce56 und *SasgA* konnte festgestellt werden, dass *SasgA* einen starken Defekt in der Differenzierung aufwies. Der Wildtyp begann nach 24 h auf P-Diff-Agar mit der Aggregation und hatte die Differenzierung nach 96 h abgeschlossen, wohingegen *SasgA* auch nach 120 h noch keine Anzeichen von Aggregation aufwies. Die *asgA*-Mutante ähnelt demnach hinsichtlich des morphologischen Differenzierungstyps den *asg*-Mutanten von *M. xanthus*, welche wie *SasgA* einen Defekt in der frühen Aggregationsbildung aufweisen.

3.2.3.3 Physiologische Differenzierung von *SasgA*

Die physiologische Differenzierung (Produktion von Sekundärmetaboliten) ist eine Art der chemischen Differenzierung, welche zumindest in Streptomyceten und Bacillen parallel zur morphologischen Differenzierung initiiert wird, wie z. B. bei der Sporulation in Streptomyceten oder Bacillen (Lengeler et al. 1999). Eine Hypothese besagt, dass der Sinn dieser gleichzeitigen morphologischen wie auch physiologischen Differenzierung dabei vermutlich dem Schutz der gebildeten Sporen vor Fressfeinden dient.

Die Myxobakterien sind ebenso wie die Streptomyceten befähigt, sowohl eine morphologische als auch eine physiologische Differenzierung zu durchlaufen. Unter den Myxobakterien wiederum

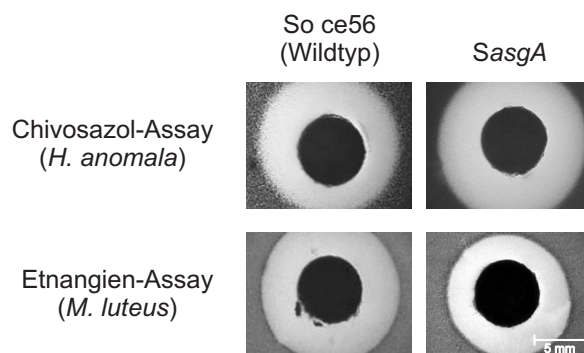


Abbildung 3.10: Physiologische Differenzierung von So ce56 (Wildtyp) und *SasgA*. Abgebildet ist die durch Zugabe der extrahierten Sekundärmetabolite erfolgte Hemmhofbildung beider Stämme. In der Mitte ist deutlich das kleine Stück Whatman-Papier zu erkennen, auf welches die Sekundärmetabolite getropft wurden. Der helle Hintergrund stellt den Hemmhof dar, wohingegen der dunklere Hintergrund das Wachstum des jeweiligen Indikator-Organismus repräsentiert. Für den Chivosazol-Assay wurde 1 μ l der Suspension an Sekundärmetaboliten getropft, für den Etnangien-Assay wurden 3 μ l eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden Methanol und dH₂O verwendet (nicht gezeigt).

nimmt die Gattung *Sorangium* eine besondere Stellung im Bereich der Sekundärmetabolitproduktion ein (siehe 1.3), da im Vergleich zu anderen Myxobakterien die meisten Sekundärmetabolite aus *Sorangium* isoliert werden konnten. So ce56 produziert nachweislich die beiden Sekundärmetabolite Chivosazol A und Etnangien (Pradella et al. 2002).

Es stellte sich die Frage, ob die *asgA*-Mutante von So ce56 durch ihren Defekt in der morphologischen Differenzierung ebenfalls in der physiologischen Differenzierung beeinträchtigt ist. Um eine qualitative Aussage über die Sekundärmetabolitproduktion von *SasgA* treffen zu können, wurde ein sogenannter Bioassay wie unter 2.2.4.2 beschrieben, durchgeführt.

Die Ergebnisse des Bioassays sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Der mittlere dunkle Punkt zeigt das kleine Stück Whatman-Papier, auf das die Sekundärmetabolit-Extrakte von So ce56 (Wildtyp) und *SasgA* aufgebracht wurden. Der hellere Bereich ist auf die Hemmung des Wachstums des jeweiligen Indikator-Organismus zurückzuführen und der darauffolgende dunklere Bereich stellt wiederum dessen Wachstum dar. Anhand der Größe des jeweiligen Hemmhofes und durch den Vergleich von Wildtyp und Mutante lässt sich eine semiquantitative Aussage über die Menge an produzierten Sekundärmetaboliten treffen.

In diesem Versuch ist deutlich zu erkennen, dass zwischen Wildtyp und Mutante kein signifikanter Unterschied in der Größe der entstandenen Hemmhöfe zu verzeichnen ist. Die Unterbrechung des *asgA*-Genes hat demnach keinen Effekt auf die Produktion der Sekundärmetabolite Chivosazol A und Etnangien.

Um genauere Aussagen über die Menge an produzierten Sekundärmetaboliten treffen zu können, wären weitere Analysen (wie z. B. HPLC-Analysen) notwendig. Da in diesem Fall kein bedeutsamer Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante sichtbar wurde, wurde diese Art der Untersuchung als nicht sinnvoll erachtet.

3.2.3.4 Degradation von Cellulose durch *SasgA*

S. cellulorum zählt zu den cellulolytischen Myxobakterien und ist daher in der Lage, sowohl unlösliche kristalline als auch lösliche Cellulose durch Cellulase und Cellobiase zu metabolisieren (Sarao et al. 1985).

Anhand eines einfachen Tropfversuches sollte die Frage geklärt werden, ob *SasgA* eventuell einen Defekt in der Cellulosedegradation aufweist. Für diesen Versuch wurden zunächst So ce56 und *SasgA*, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, angezogen und aufkonzentriert. Anschließend wurden je 50 μl der aufkonzentrierten Zellsuspensionen auf ein einlagiges Stückchen Cellulose-Papier (KimWipes® Lite; Kimberley-Clark) getropft. Als Agar-Untergrund diente P-Diff. Die Platten wurden bei 32 °C inkubiert.

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse des Versuches abgebildet. Nach etwa 10 Tagen Inkubation bei 32 °C konnten bei beiden Stämmen helle Stellen auf dem sonst dunkleren Hintergrund des Cellulose-Papieres ausgemacht werden. Bei genauerer Betrachtung konnten an diesen Stellen keine Fasern von Cellulose mehr gefunden werden. Somit ist *SasgA* wie auch der Wildtyp in der Lage, Cellulose zu zersetzen.

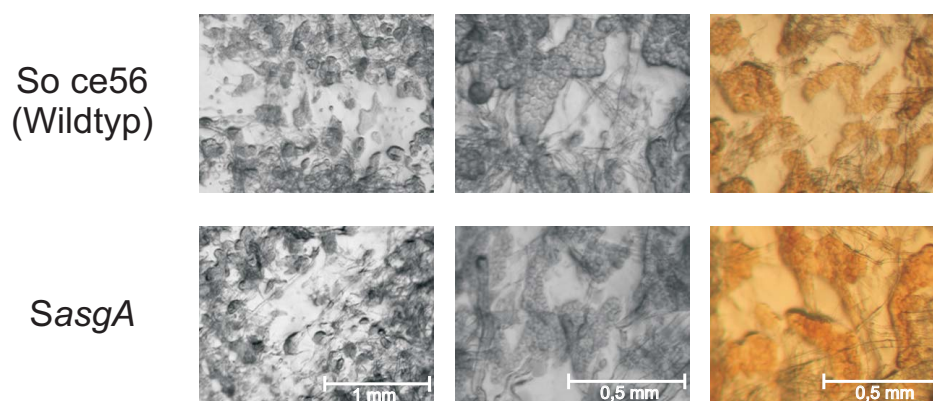


Abbildung 3.11: Degradationsversuch mit So ce56 (Wildtyp) und *SasgA* auf Cellulose. Die Celluloseplättchen wurde für diesen Versuch auf P-Diff-Agar gelegt. Die Platten wurden für insgesamt 10 Tage bei 32 °C inkubiert. Die hellen Stellen markieren den Bereich der Cellulosezersetzung durch den jeweiligen Stamm. Die dunklen Bereiche kennzeichnen die noch vorhandene Schicht an Cellulose. Des Weiteren kann man bei genauerer Betrachtung sowohl bei So ce56 (Wildtyp) und *SasgA* Fruchtkörper-„Ansätze“ erkennen.

3.2.4 Differenzierungsabhängige Expression von *asgA* in *S. cellulorum* So ce56

Positive Regulation der *asgA*- Expression unter Differenzierungsbedingungen

Von *asgA* aus *M. xanthus* ist bekannt, dass dieses differenzierungsabhängig reguliert bzw. exprimiert wird. Um die *asgA*-Expression in *S. cellulorum* hinsichtlich der Differenzierung zu untersuchen, wurde die relative Expression von *asgA* anhand einer Real-time RT-PCR unter Verwendung der primer *asgAint+* und *asgAint-* bestimmt. Die Real-time RT-PCR wurde wie unter 2.6.4 beschrieben durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde aus Proben isoliert, die nach 0 h, 3 h und 6 h Differenzierung in M-Diff-Medium entnommen wurden, wovon je 40 ng Gesamt-RNA für die Real-time RT-PCR eingesetzt wurden. Als Referenz wurde 16S rRNA verwendet,

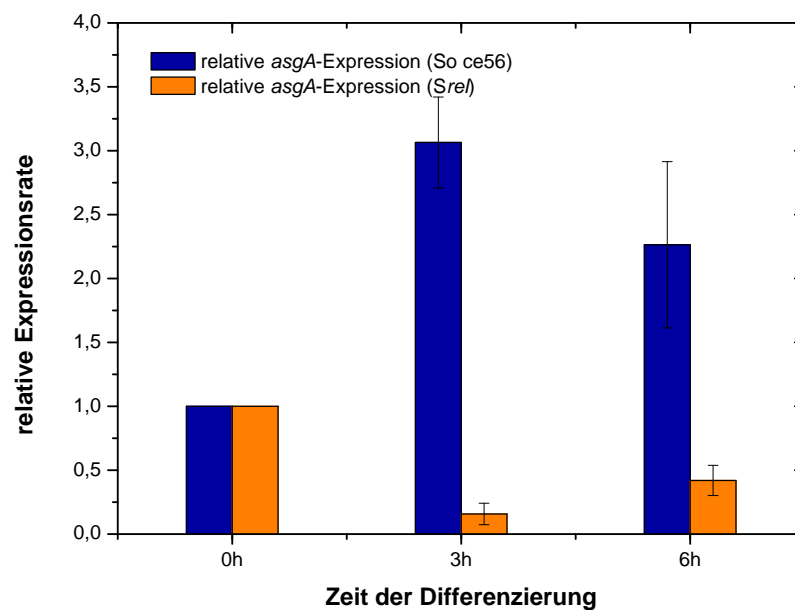


Abbildung 3.12: Bestimmung der relativen Expression des *asgA*-Gens in So ce56 und *Srel* während der Differenzierung durch Real-time RT-PCR. Zu den angegebenen Zeitpunkten (0 h, 3 h und 6 h Differenzierung) wurde die Gesamt-RNA isoliert. Die Expression zum Zeitpunkt 0 h wurde als 1 definiert und die Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten dazu in Relation gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an. Als Referenz wurde 16S rRNA verwendet.

deren Expressionslevel anhand der Real-time RT-PCR-Daten überprüft wurden. Die relative Expression zum Zeitpunkt 0 h wurde als 1 definiert und die *asgA*-Expression an den folgenden zwei Zeitpunkten (3 h und 6 h Differenzierung) dazu in Relation gesetzt.

Die Ergebnisse der Real-time RT-PCR, die in Abbildung 3.12 graphisch dargestellt sind, ergaben eine positive Regulation der Expression von *asgA* aus So ce56 unter Differenzierungsbedingungen. Nach 3 h Differenzierung konnte eine Zunahme der relativen Expression auf 3,06 ermittelt werden, die nach weiteren 3 h Differenzierung (t_6) wieder auf 2,3 abnahm. Somit wird *asgA* in So ce56 unter Differenzierungsbedingungen angeschaltet.

3.2.5 Die *asgA*- Expression steht unter stringenter Kontrolle

In *M. xanthus* spielt nicht nur das A-Signal für die Einleitung der Differenzierung eine wichtige Rolle, sondern auch die (p)ppGpp-Produktion (Guanosinpentaphosphat; Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat), welche als Initiationssignal der Differenzierung identifiziert wurde (Singer & Kaiser 1995). Die Akkumulation von (p)ppGpp erfolgt unter Nährstofflimitierung und ist für die Expression von Genen notwendig, die in der frühen Phase der Differenzierung wichtig sind. Dazu gehört unter anderem auch das *asgA*-Gen. In *M. xanthus* ist demnach das A-Signal abhängig von der (p)ppGpp-Produktion.

Um eine Abhängigkeit der *asgA*-Expression von der (p)ppGpp-Akkumulation in So ce56 festzustellen, wurde eine weitere Real-time RT-PCR durchgeführt. Es wurde die relative *asgA*-Expression in *Srel*, der *stringent response*-Mutante (Knauber 2006), untersucht. Die Real-time

RT-PCR wurde wie unter 2.6.4 und 3.2.4 beschrieben durchgeführt und wurde zeitgleich mit der vorherigen Real-time RT-PCR (siehe 3.2.4) angesetzt. In Abbildung 3.12 ist das Ergebnis der Real-time RT-PCR auf Gesamt-RNA von So ce56 und der *rel*-Mutante graphisch dargestellt.

Wie zuvor schon gezeigt, erfolgte eine positive Regulation der Expression von *asgA* in So ce56 unter Differenzierungsbedingungen, die sich in der Zunahme der relativen Expression des *asgA*-Genes äußerte. In *Srel* dagegen zeigte sich eine Abnahme der relativen Expression auf 0,16 (3 h) bzw. 0,25 (6 h) und somit eine negative Regulation der Expression. Daraus lässt sich schließen, dass die Expression von *asgA* in So ce56 ebenso wie in *M. xanthus* unter stringenter Kontrolle bzw. unter der Kontrolle von (p)ppGpp steht.

3.3 Einfluss der Lon-Proteasen auf die Regulation des Metabolismus von *S. cellulosum* So ce56

Ebenso wie für *asgA* konnte auch für *bsgA* ($\hat{=}$ *lonD*) von *M. xanthus* eine Beteiligung an der Differenzierung von *M. xanthus* beobachtet werden. Dabei wird *bsgA* bzw. *lonD* dem B-Signal zugeordnet (Kaiser 2004), wobei eine genaue Charakterisierung des Signal-Moleküls noch fehlt. Der Defekt von *bsgA*- bzw. *lonD*-Mutanten in *M. xanthus* äußert sich in einer frühen Blockierung der Differenzierung (Tojo et al. 1993).

Lon-Proteasen spielen im Allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Proteinkontrolle. Die steigende Anzahl an regulatorischen Proteinen, die als spezifische Lon-Substrate identifiziert werden konnten (siehe auch 1.3.1), weisen jedoch auch auf eine Beteiligung der Lon-Proteasen an der Regulation verschiedener biologischer Prozesse in Bakterien hin (Tsilibaris et al. 2006).

Anhand dieses Hintergrundes sollte im Rahmen dieser Arbeit, die Rolle der Lon-Proteasen in Bezug auf die morphologische Differenzierung in So ce56 und die Frage nach spezifischen Substraten der Lon-Proteasen in So ce56 geklärt werden.

3.3.1 Lon-Protease-Homologe im Genom von *S. cellulosum* So ce56

Durch Annotation des Genoms von So ce56 sowie durch Sequenzvergleiche von *bsgA* bzw. *lonD* und *lonV* aus *M. xanthus* mit dem Genom von So ce56 konnten mehrere *lon*-homologe Gene identifiziert werden. Die Aminosäuresequenzen der *lon*-homologen Proteine aus So ce56 wurden zunächst mit den bekannten Lon-Proteasen aus *M. xanthus*, *B. subtilis* und *E. coli* verglichen. Der Tabelle 3.3 sowie der Tabelle 3.4 können die Homologien in % Identität entnommen werden.

Mit Hilfe der *Biology workbench 3.2* (<http://workbench.sdsc.edu>) wurden weitere Lon-Orthologe mit denen aus So ce56 unter Verwendung einer ClustalW-Analyse (Higgins et al. 1992, Thompson et al. 1994) miteinander verglichen.

Abbildung 3.13 zeigt die phylogenetischen Analysen verschiedener Lon-Orthologe in Bezug zu Lon1-5 aus So ce56. Die phylogenetische Analyse zeigt eine zentrale Gruppe an Lon-Orthologen (unterer grauer Bereich), zu der auch Lon aus *E. coli* und LonA aus *B. subtilis* gehören. Des Weiteren wurde LonV aus *M. xanthus* und Lon3 aus So ce56 dieser zentralen Gruppe zugeordnet. Anhand dieser Verwandtschaft wurde die Hypothese aufgestellt, dass Lon3 aus So ce56 eventuell

Tabelle 3.3: Homologien der möglichen Lon-homologen Proteine aus *So ce56* im Vergleich zu LonV und LonD von *M. xanthus*. Der Wert des *e-values* drückt aus, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Ähnlichkeit der gesuchten Sequenz mit der gefundenen Sequenz rein zufällig ist. Je näher bei Null bzw. je kleiner dieser Wert ist, desto signifikanter ist die Übereinstimmung der verglichenen Sequenzen. Abkürzung aa = *amino acids*.

Lon-homologe Proteine	Länge	<i>e-value</i>	Identität zu LonV (<i>M. xanthus</i>)	Identität zu LonD (<i>M. xanthus</i>)
Lon1 (Sce4504)	799 aa	0.0	41%	53%
Lon2 (Sce2838)	804 aa	0.0	45%	53%
Lon3 (Sce3149)	830 aa	0.0	69%	47%
Lon4 (Sce5003)	817 aa	0.0	48%	60%
Lon5 (Sce0897)	811 aa	0.0	43%	46%

ebenso wie LonV eine wichtige Rolle im vegetativen Stadium von *So ce56* spielt.

Neben dieser zentralen Gruppe kann eine weitere Gruppe an Lon-Orthologen zusammengefasst werden, welche die Lon-Proteasen LonD aus *M. xanthus* sowie Lon1, Lon2 und Lon4 aus *So ce56* beinhaltet. Ebenso wie in der ersten Gruppe kann anhand des phylogenetischen Stammbaumes vermutet werden, dass die drei Lon-Proteasen (Lon1, Lon2 und Lon4) aus *So ce56* eine wichtige Rolle im Differenzierungsprozess von *So ce56* spielen.

Tabelle 3.4: Homologien der möglichen Lon-homologen Proteine aus *So ce56* im Vergleich zu LonA und LonB von *B. subtilis* und Lon von *E. coli*. Der Wert des *e-values* drückt aus, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Ähnlichkeit der gesuchten Sequenz mit der gefundenen Sequenz rein zufällig ist. Je näher bei Null bzw. je kleiner dieser Wert ist, desto signifikanter ist die Übereinstimmung der verglichenen Sequenzen. Abkürzung aa = *amino acids*.

Lon-homologe Proteine	<i>e-value</i>	Identität zu LonA (<i>B. subtilis</i>)	<i>e-value</i>	Identität zu LonB (<i>B. subtilis</i>)	<i>e-value</i>	Identität zu Lon (<i>E. coli</i>)
Lon1 (Sce4504)	0.0	45%	3e-18	25%	0.0	44%
Lon2 (Sce2838)	0.0	45%	1e-22	25%	0.0	43%
Lon3 (Sce3149)	0.0	52%	8e-25	25%	0.0	56%
Lon4 (Sce5003)	0.0	49%	3e-22	25%	0.0	47%
Lon5 (Sce0897)	0.0	44%	4e-21	25%	e-178	43%

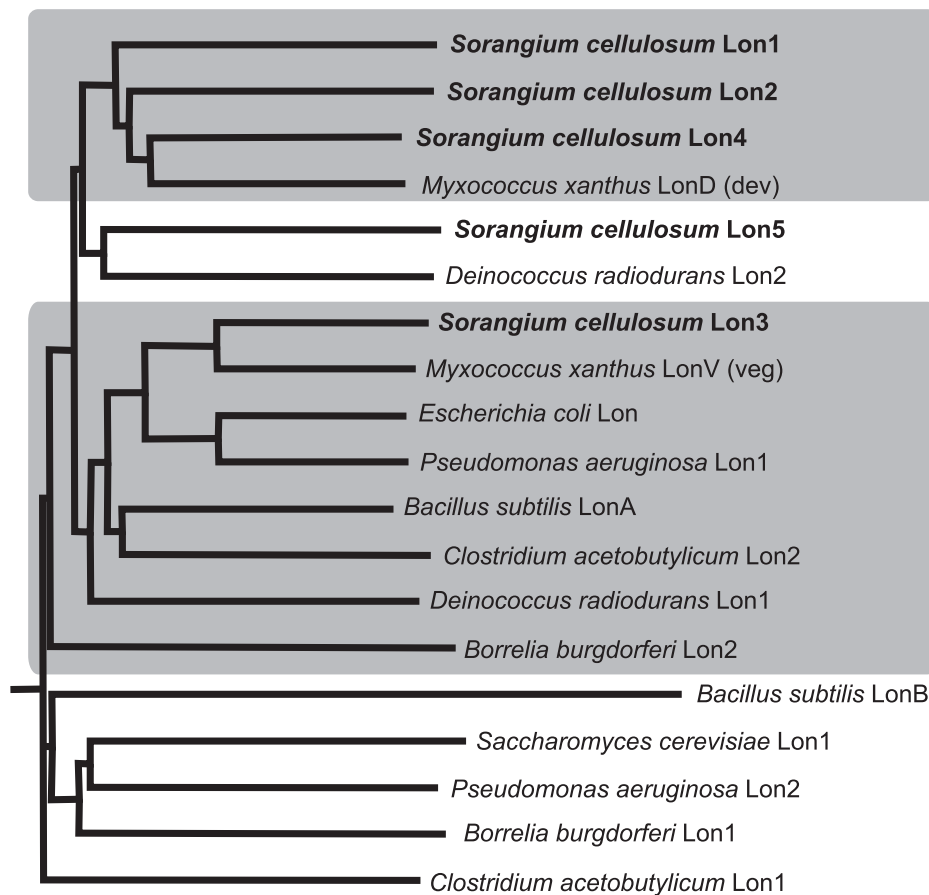


Abbildung 3.13: Phylogenetische Analyse mit den Aminosäuresequenzen verschiedener ausgewählter Lon-Proteasen basierend auf einer *ClustalW*-Analyse (*SDSC Biology workbench 3.2* (Higgins et al. 1992, Thompson et al. 1994)). Gruppen an Orthologen sind farblich (weiß; grau) voneinander abgegrenzt.

3.3.1.1 Die *lon*-Regionen im Genom von *S. cellulosum* und weiteren Organismen

Um die genetische Organisation der verschiedenen *lon*-Regionen miteinander zu vergleichen, wurden diese aus den Genomen maßstabsgetreu übernommen (Abb. 3.14). Bei dem Vergleich der verschiedenen *lon*-Regionen aus *So ce56*, *M. xanthus*, *B. subtilis* und *E. coli* fiel auf, dass sowohl die *lonV*-Region aus *M. xanthus* und die *lon3*-Region aus *So ce56* als auch die *lonA/B*-Region aus *B. subtilis* und die *lon*-Region aus *E. coli* eine gemeinsame genetische Organisation der Region aufweisen. Neben dem Gen, welches eine Lon-Protease kodiert, finden sich die Gene *clpX*, *clpP* und *tig*. Das Gen *clpX* kodiert die regulatorische ATPase-Domäne der ClpXP-Protease, während *clpP* wiederum die proteolytische Komponente der ClpXP-Protease kodiert. Das Gen *tig* kodiert den Triggerfaktor (TF), der spezifisch an die große Untereinheit des Ribosoms nahe der Polypeptidaustrittsstelle bindet.

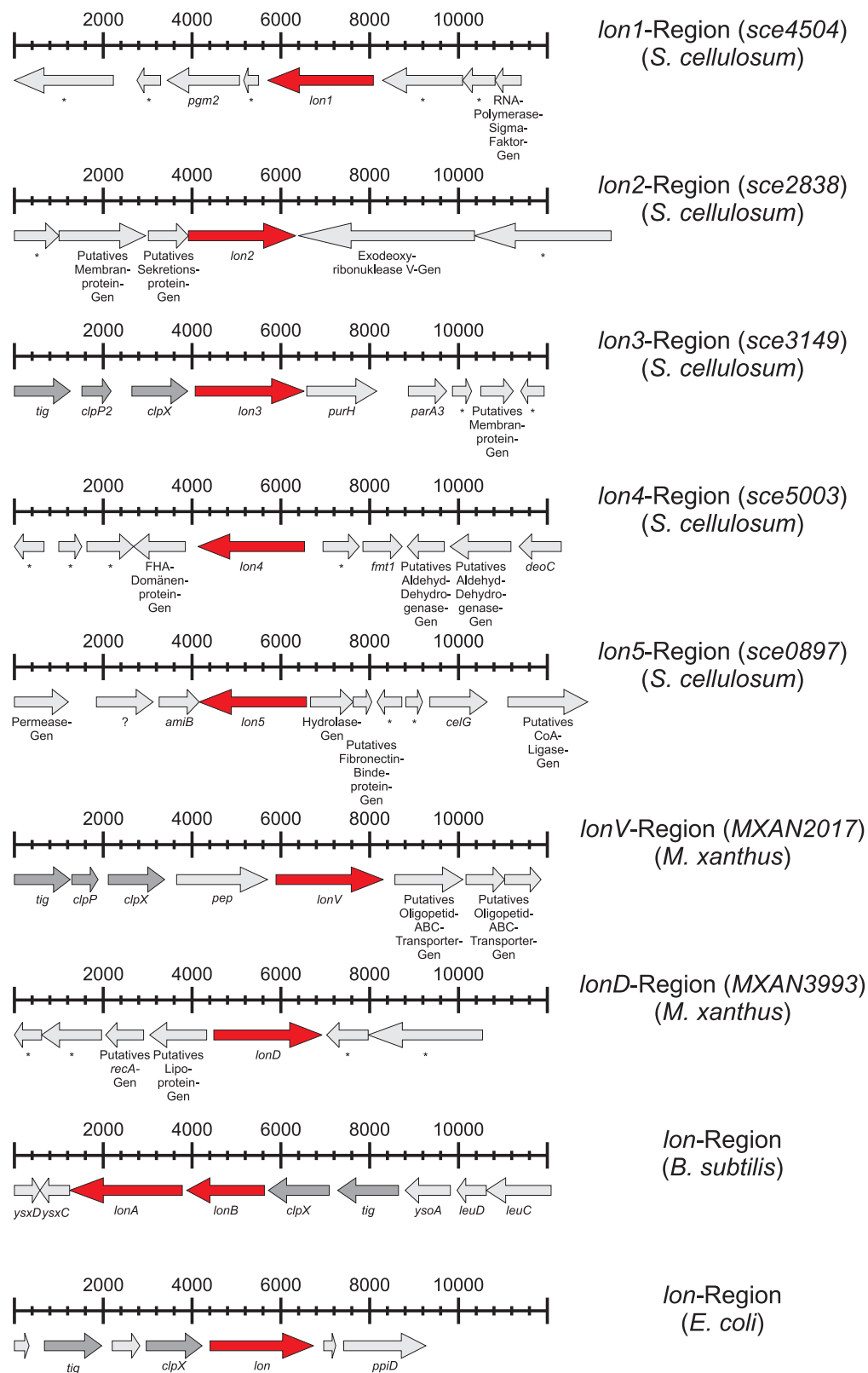


Abbildung 3.14: Genetische Organisation der *lon*-Regionen von *So ce56*, *M. xanthus*, *B. subtilis* und *E. coli*. Die Bezeichnung und Zuordnung der Gene wurde direkt aus den Genomen übertragen. Die *lon*-Gene sind rot dargestellt. *clpX* kodiert die regulatorische ATPase-Domäne der ClpXP-Protease; *clpP* kodiert die proteolytische Komponente der ClpXP-Protease und *tig* kodiert den Triggerfaktor (TF), der spezifisch an die große Untereinheit des Ribosoms nahe der Polypeptidaustrittsstelle bindet. Die Genregionen sind maßstabsgetreu dargestellt.

3.3.2 Konstruktion der *S. cellulosum* So ce56 *lon*- Mutanten

Auf Grund der zuvor erwähnten Erkenntnisse wurde im weiteren Verlauf die Konstruktion von *lon*-Mutanten in So ce56 angestrebt, um eine Aussage über die Funktion der Gene in So ce56 treffen zu können.

3.3.2.1 Klonierung der Konjugationsplasmide pSUPHyg *lon1-5* und Konjugation nach *S. cellulosum* So ce56

Zur Konstruktion der *lon*-Insertionsmutanten in So ce56 wurden zunächst interne Fragmente von *lon1-5* unter Verwendung der in Tabelle 3.5 aufgelisteten *primer* mittels *FailSafe*TM PCR (siehe 2.6) bzw. mit Pfu-Polymerase von chromosomaler DNA von So ce56 amplifiziert. Die PCR verlief unter Standardbedingungen. Zur präparativen Aufreinigung der PCR-Amplifikate wurden diese aus einem 1 %igen Agarosegel extrahiert (siehe 2.4.7.1). Die Produkte wurden mit Hilfe des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR®-XL-TOPO® bzw. pCR®-BLUNT II-TOPO® kloniert (siehe 3.5). Nach der Klonierung der PCR-Produkte in diese Vektoren, wurden diese in *E. coli* MACH-1 vermehrt. Die erhaltenen Klone wurden mit Hilfe von PCR und verschiedenen Restriktionen überprüft.

Tabelle 3.5: Für die Klonierung der Konjugationsplasmide pSUPHyg *lon1-5* verwendete *primer* und TOPO®-Vektoren. Für die Amplifikation der Fragmente wurden zwei Polymerasen verwendet: *FailSafe*TM (für die Klonierung in pCR®-XL-TOPO®) und Pfu-Polymerase (für die Klonierung in pCR®-BLUNT II-TOPO®)

<i>lon</i> - Fragmente	<i>primer</i>	Fragment- größe	verwendete TOPO®- Vektoren
<i>lon1</i> int	<i>bsgA</i> int+/ <i>bsgA</i> int-	830 bp	pCR®-XL-TOPO®
<i>lon2</i> int	<i>socelon2</i> +/ <i>socelon</i> -	948 bp	pCR®-XL-TOPO®
<i>lon3</i> int	<i>socelon3</i> +/ <i>socelon3</i> int-	951 bp	pCR®-BLUNT II-TOPO®
<i>lon4</i> int	<i>socelon4</i> +/ <i>socelon</i> -	942 bp	pCR®-BLUNT II-TOPO®
<i>lon5</i> int	<i>socelon5</i> +/ <i>socelon</i> -	948 bp	pCR®-BLUNT II-TOPO®

Über die Schnittstellen HindIII und SphI bzw. im Fall von pCR®-BLUNT II-TOPO® *lon4* HindIII und EcoRV wurden die über ein Agarosegel extrahierten Fragmente in die entsprechenden dephosphorylierten Schnittstellen des Konjugationsvektors pSUPHyg kloniert. In Abbildung 3.15 ist exemplarisch das daraus resultierende Plasmid pSUPHyg *lon1* schematisch dargestellt. Die erhaltenen Klone wurde ebenfalls per PCR und verschiedener Restriktionsverdaus überprüft.

Die konstruierten Plasmide pSUPHyg *lon1-5* wurden in die in Tabelle 3.6 aufgelisteten *E. coli* Stämme transformiert und nach *S. cellulosum* konjugiert (siehe 2.3.2). Zur ersten Überprüfung der potenziellen Mutanten wurde das Wachstum in Komplexmedium getestet. Für die weitere

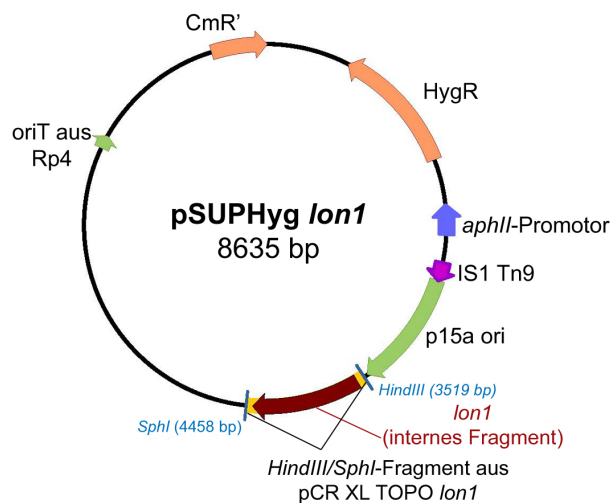


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung von pSUPHyg *lon1*. Die Schnittstellen HindIII und SphI sind bei der Klonierung erhalten geblieben. Das HindIII/SphI-Fragment aus pCR XL TOPO *lon1* bezeichnet den Bereich, der aus dem pCR®-XL-TOPO® *lon1*-Vektor in pSUPHyg kloniert wurde. Die Graphiken wurden mit der Software Vector NTI generiert. HygR = Hygromycinresistenzgen unter der Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes (*aphII*-Promotor); CmR' = zerstörtes Chloramphenicolresistenzgen.

Überprüfung der angewachsenen potenziellen Mutanten wurde deren chromosomale DNA isoliert und verschiedene PCRs bzw. ein PCR-Schnelltest durchgeführt. Abbildung 3.16 veranschaulicht exemplarisch die homologe Rekombination von pSUPHyg *lon1* in das Chromosom von *So ce56*.

Durch den Vergleich unterschiedlicher PCRs auf den potenziellen *S. cellulosum lon1-5*-Mutanten, dem Wildtyp und dem jeweiligen Konjugationsplasmid pSUPHyg *lon1-5*, konnten Mutanten

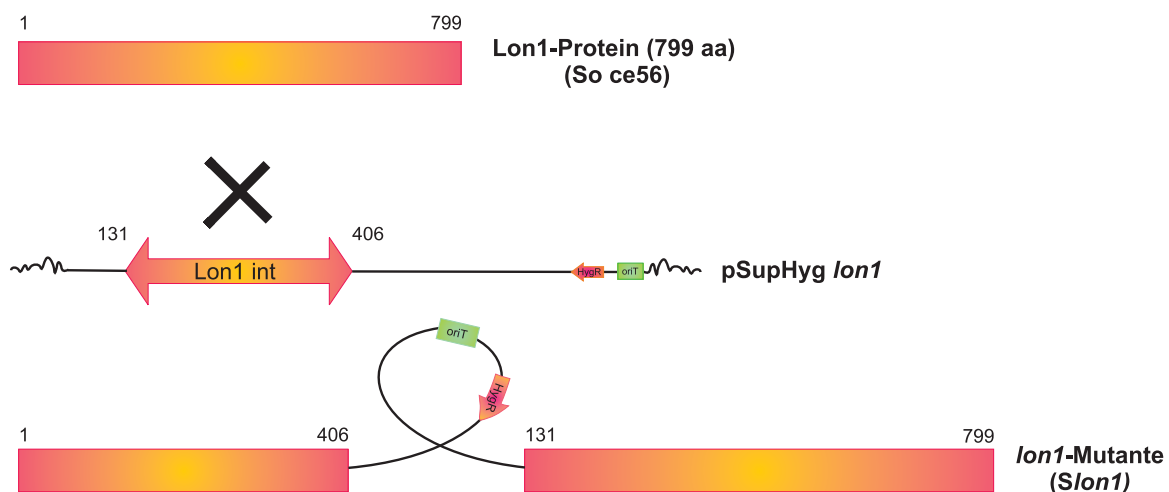


Abbildung 3.16: Konstruktion der *Slon1*-Mutante durch homologe Rekombination von pSUPHyg *lon1* in das Chromosom von *So ce56*. Für die Konstruktion der *lon1*-Mutante in *So ce56* wurde ein internes Fragment von *lon1* in den Konjugationsvektor pSUPHyg kloniert. Der Vektor pSUPHyg *lon1* wurde durch ein „single crossover“-Ereignis in das Genom von *So ce56* integriert. Dies hatte zur Folge, dass *lon1* durch die Vektorsequenz (pSUPHyg *lon1*) unterbrochen wurde. Für ein vollständig kodierte Protein fehlen daher 393 aa vom C-terminalen Ende (a).

Tabelle 3.6: Für die Konjugation von pSUPHyg *lon1-5* verwendete *E. coli*- Stämme (*tra*⁺).

pSUPHyg <i>lon1-5</i>	verwendete <i>E. coli</i>
pSUPHyg <i>lon1</i>	S17-1
pSUPHyg <i>lon2</i>	ET12567 pUB307
pSUPHyg <i>lon3</i>	ET12567 pUB307
pSUPHyg <i>lon4</i>	ET12567 pUB307
pSUPHyg <i>lon5</i>	S17-1

identifiziert werden, bei denen eine erfolgreiche homologe Rekombination von pSUPHyg *lon1-5* in das Chromosom stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Durch die homologe Rekombination des jeweiligen Plasmids in das Genom von So ce56 wurden die Gene unterbrochen. Damit kann, wenn überhaupt, nur noch der N-terminale Bereich des jeweiligen Proteins gebildet werden. Durch die Unterbrechung des jeweiligen Genes würden für ein vollständig kodiertes Protein, folgende Bereiche des C-terminalen Endes fehlen:

- Lon1: 393 aa (49% von Lon1)
- Lon2: 343 aa (43% von Lon2)
- Lon3: 369 aa (45% von Lon3)
- Lon4: 355 aa (45% von Lon4)
- Lon5: 342 aa (42% von Lon5)

Mit diesen Mutanten wurde in den folgenden Versuchen weitergearbeitet. Bezeichnet werden die Mutanten im Folgenden als *Slon1*, *Slon2*, *Slon3*, *Slon4*, und *Slon5*.

3.3.3 Phänotypische Charakterisierung der *lon*- Mutanten von *S. cellulorum* So ce56

3.3.3.1 Wachstum unter vegetativen Bedingungen

Um den Einfluss der Mutationen in den *lon*-Genen der verschiedenen Mutanten auf das vegetative Wachstum zu testen, wurde das Wachstum im Komplexmedium M anhand der Bestimmung der optischen Dichte in Klett verfolgt. Dafür wurden die in M-Medium angezogenen Kulturen von So ce56 (Wildtyp) und der verschiedenen *Slon*-Mutanten auf einen Klettwert von 20 in M-Medium überimpft. Das Wachstum wurde so lange verfolgt, bis die Kulturen die stationäre Phase des Wachstums erreichten.

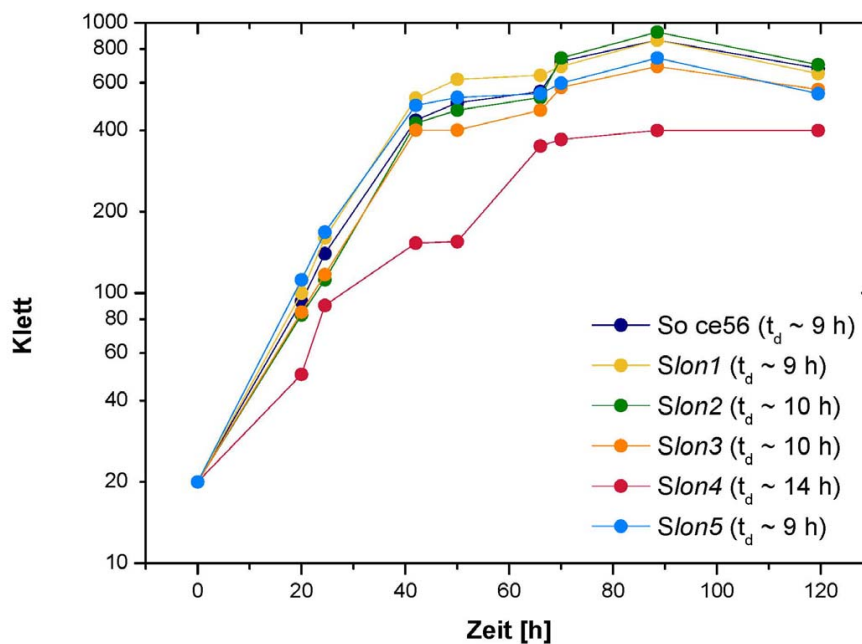


Abbildung 3.17: Wachstum von *So ce56* (Wildtyp) und *Slon1-5* in dem Komplexmedium M. Der Verlauf der Wachstumskurve wurde mit Klettmessungen verfolgt.

In Abbildung 3.17 ist ein Wachstumsverlauf der verschiedenen Stämme graphisch dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte außer *Slon4* keine der anderen *lon*-Mutanten eine Beeinträchtigung im Wachstum, welches sich auch in folgenden Experimenten nachweisen ließ. Auffällig war bei den verschiedenen Wachstumsversuchen nur, dass die Kulturen nicht immer im gleichen Maß wuchsen. Dies äußerte sich in zeitlich getrennten Versuchen durch Erreichen unterschiedlicher Klettwerte, wobei sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten gleichermaßen durch „äußere Bedingungen“ beeinflusst wurden. Auf Grund dessen wurden die Ergebnisse der verschiedenen Wachstumsversuche nicht gemittelt. Die Tendenz der Wachstumsversuche blieb jedoch gleich.

Im Gegensatz zu *Slon1*, *Slon2*, *Slon3* und *Slon5* zeigte *Slon4* schon im vegetativen Wachstum einen auffälligeren Phänotyp, welcher sich in schlechterem Wachstum unter vegetativen Bedingungen äußerte. Hierbei muss erwähnt werden, dass der abgebildete Wachstumsverlauf von *Slon4* nur erreicht werden konnte, indem *Slon4* von einer frischen M-Agarplatte in M-Medium inokuliert wurde. Erst dadurch wurde es möglich, *Slon4* bis Erreichen der stationären Phase anzuziehen. Im Laufe von verschiedenen Experimentansätzen konnte festgestellt werden, dass *Slon4* sowohl auf M-Agarplatten als auch in M-Flüssigkultur nicht lange überlebensfähig war. Demnach scheint die Mutation im *lon4*-Gen zwar nicht in erster Linie letal zu sein, über einen längeren Zeitraum beobachtet, scheint die Mutation aber dennoch das Überleben von *Slon4* zu beeinträchtigen.

Es sei hier noch erwähnt, dass ähnliche Wachstumsversuche auch in dem synthetischen Medium SM (2.2.1.7) durchgeführt wurden, die jedoch zum gleichen Ergebnis führten (Daten nicht gezeigt).

3.3.3.2 Morphologische Differenzierung der verschiedenen *lon*- Mutanten von So ce56

Ebenso wie für *asgA* von *M. xanthus* konnte für *lonD* bzw. *bsgA* eine Beteiligung an der Differenzierung gezeigt werden (Tojo et al. 1993). Vermutet wird, das LonD die Verfügbarkeit von Aminosäuren für die Neusynthese von Proteinen während der Differenzierung unterstützt (Gottesman & Maurizi 2001).

Von *bsgA330*-Mutanten von *M. xanthus* wurde berichtet, dass diese ebenso wie die *asgA*-Mutanten in *M. xanthus* einen Aggregationsdefekt aufweisen (Kaiser 2004).

Um den morphologischen Phänotyp der *Slon*-Mutanten unter Differenzierungsbedingungen beobachten zu können, wurde wiederum ein Differenzierungsassay durchgeführt. Der Differenzierungsassay wurde für So ce56 und *Slon1-5* wie unter 2.2.4.1 und 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 gezeigt.

Jede der einzelnen Mutanten wies im Vergleich zum Wildtyp, aber auch untereinander, einen anderen Differenzierungsphänotyp auf. Keine der Mutanten zeigte den gleichen Phänotyp unter Differenzierungsbedingungen.

Slon1 begann mit der Aggregation, blieb jedoch in diesem Stadium stehen und konnte die Differenzierung nicht beenden. *Slon2* hingegen aggregierte und bildete sogar ansatzweise Fruchtkörper. Diese Mutante zeigte aber keine Ausbildung der charakteristischen Sporangien innerhalb der Fruchtkörper. Im Gegensatz zu allen weiteren Mutanten ist *Slon2* erst spät in der Differenzierung inhibiert. *Slon3* war ebenfalls noch in der Lage, kleine Aggregate zu bilden, wobei diese in der Größe deutlich von denen des Wildtyps abwichen. Eine weitere Differenzierung zu Fruchtkörpern war jedoch nicht auszumachen. Während diese drei soeben genannten Mutanten noch in der Lage waren, den ersten Schritt der Differenzierung in Form der Aggregatbildung zu vollziehen, war die *Slon4*-Mutante noch nicht mal fähig, Aggregate auszubilden. *Slon4* zeigte unter Differenzierungsbedingungen weder die Ausbildung von Aggregaten noch war ein Ansatz davon zu sehen. *Slon5* dagegen war noch in geringem Maße fähig, Aggregate auszubilden, die sich aber wiederum von denen des Wildtyps und der anderen Mutanten unterschieden. Erkennbar war hierbei nur das Schwärmen der Zellen zu sogenannten Aggregaten durch die Ausbildung von „Löchern“ im Zellrasen (weiße Stellen im Bild).

Abschließend lässt sich festhalten, dass fünf unterschiedliche *lon*-Mutanten in So ce56 konstruiert wurden, die jeweils einen anderen Differenzierungsphänotyp sowohl im Vergleich mit dem Wildtyp als auch untereinander aufwiesen.

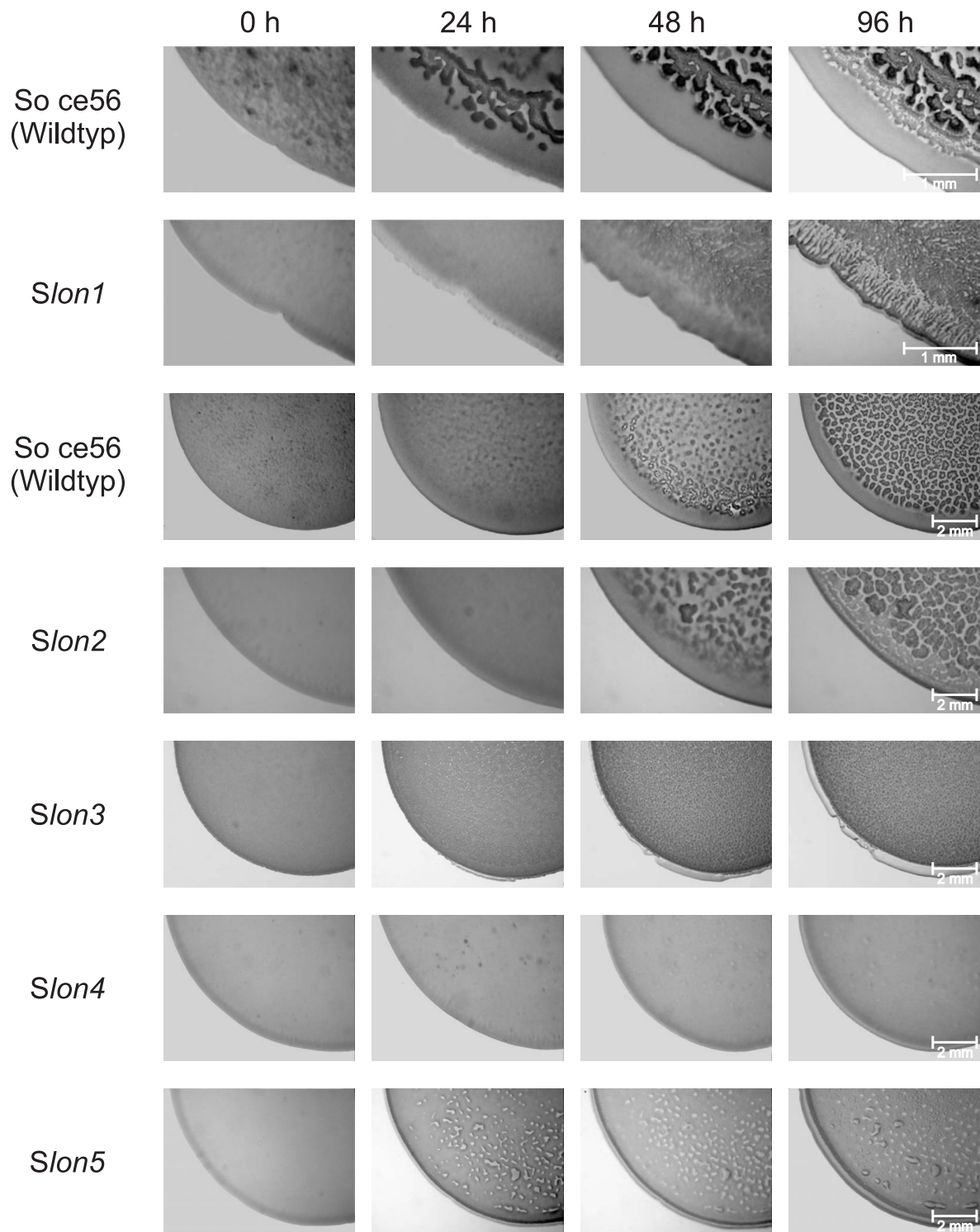


Abbildung 3.18: Phänotyp der morphologischen Differenzierung der verschiedenen *Slon*-Mutanten. Der Differenzierungsassay wurde wie unter 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Die Differenzierung wurde über eine Zeitspanne von 4 Tagen beobachtet. Der Differenzierungsphänotyp von *So ce56* ist zweimal abgebildet, da auf Grund zeitlicher Trennung der Durchführung der Differenzierungsassays, für *Slon1* Bilder mit einer höheren Auflösung gemacht wurden.

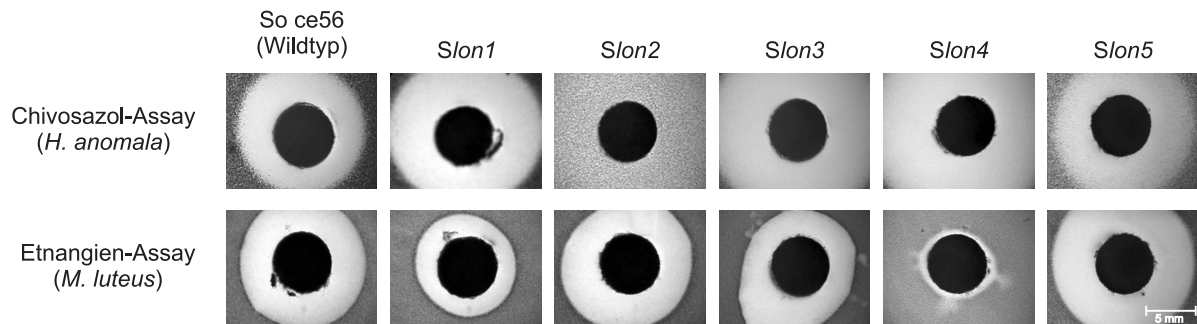


Abbildung 3.19: Physiologische Differenzierung von So ce56 (Wildtyp) und der *Slon1-5*. Abgebildet sind die Ergebnisse der durch Zugabe von extrahierten Sekundärmetaboliten erfolgte Hemmhofbildung der Stämme. In der Mitte ist deutlich das kleine Stück Whatman-Papier zu erkennen, auf welches die Sekundärmetabolite getropft wurden. Der helle Hintergrund stellt den Hemmhof dar, wohingegen der dunklere Hintergrund das Wachstum des jeweiligen Indikator-Organismus repräsentiert. Für den Chivosazol-Assay wurden $1\ \mu\text{l}$ der Suspension an Sekundärmetaboliten getropft, für den Etnangien-Assay wurden $3\ \mu\text{l}$ eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden Methanol und dH_2O verwendet (nicht gezeigt).

3.3.3.3 Bestimmung des physiologischen Phänotyps der *Slon*- Mutanten

Im weiteren Verlauf wurde getestet, inwieweit diese Mutanten in der physiologischen Differenzierung beeinträchtigt sind bzw. wie sich die Mutationen auf die Produktion von Sekundärmetaboliten auswirken. Um die Produktion von Sekundärmetaboliten zu untersuchen, wurde ein sogenannter Bioassay wie unter 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse des Bioassays sind in Abbildung 3.19 dargestellt. Im Vergleich der Größe der ausgebildeten Hemmhöfe bezüglich der Produktion von Chivosazol und Etnangien vom Wildtyp mit denen der Mutanten zeigte sich, dass zwei Mutanten eine Inhibierung in der Sekundärmetabolitproduktion aufwiesen, wohingegen die anderen sich in der Hemmhofbildung nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden. *Slon2* scheint anhand des optischen Vergleiches mit dem Wildtyp eine verminderte Chivosazolproduktion aufzuweisen, wohingegen *Slon4* nicht in der Lage ist, Etnangien zu produzieren. In beiden Fällen scheint demnach die Mutation in dem jeweiligen Gen einen Defekt in der Produktion von Chivosazol (*Slon2*) bzw. in der Produktion von Etnangien (*Slon4*) auszulösen.

Beide Aussagen konnten aber nur anhand des Bioassays getroffen werden, wobei dieser mehrere Male wiederholt wurde. Um genauere Aussagen über die Menge an produzierten Sekundärmetaboliten treffen zu können, wären weitere Analysen (wie z. B. HPLC-Analysen) notwendig gewesen. Diese wurden an dieser Stelle jedoch nicht durchgeführt, da in erster Linie die spezifischen Substrate dieser Lon-Proteasen identifiziert werden sollten.

Untersuchung des physiologischen Phänotyps von *Slon2*

Zur weiteren Untersuchung des Phänotyps von *Slon2* bezüglich der Produktion von Chivosazol wurde die relative Expression des *chiB*-Genes aus *S. cellulosum*s So ce56 und *Slon2* während der Differenzierung durch Real-time RT-PCR bestimmt. Die Isolierung der Gesamt-RNA sowie die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 2.4.4 und 2.6.4 beschrieben. Als *primer* kamen *chivo156* For und *chivo156* Rev zum Einsatz. Als Referenz wurde wiederum 16S rRNA verwendet. Die

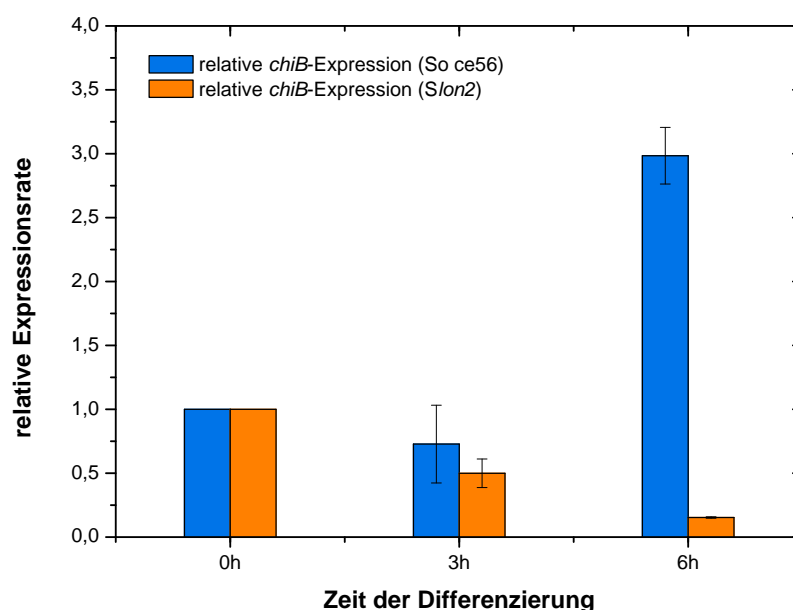


Abbildung 3.20: Bestimmung der relativen Expression des *chiB*-Genes aus *So ce56* und *Slon2* während der Differenzierung durch Real-time RT-PCR. Das *chiB*-Gen ist eines von sieben Genen aus dem Chivosazol-Gencluster von *So ce56*. Zu den angegebenen Zeitpunkten (0 h, 3 h und 6 h Differenzierung) wurde die Gesamt-RNA isoliert. Die Expression zum Zeitpunkt 0 h wurde als 1 definiert und die Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten dazu in Relation gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an. Als Referenz wurde 16S rRNA verwendet.

relative Expression zum Zeitpunkt 0 h wurde als 1 definiert und die jeweilige *lon*-Expression an den folgenden zwei Zeitpunkten (3 h und 6 h Differenzierung) dazu in Relation gesetzt.

Die Ergebnisse der Real-time RT-PCR, die in Abbildung 3.20 graphisch dargestellt sind, ergaben für *So ce56* eine positive Regulation der Expression des *chiB*-Genes nach 6 h Differenzierung. Nach 3 h Differenzierung konnte eine geringfügige Abnahme der relativen Expression des *chiB*-Genes auf 0,7 verzeichnet werden, nach 6 h Differenzierung kam es jedoch wiederum zu einer Zunahme auf 2,98. Für die relative Expression des *chiB*-Genes in *Slon2* wurde dagegen eine negative Regulation der Expression ermittelt. Hier kam es nach 3 h zu einer Abnahme der relativen Expression auf 0,5 und nach weiteren 3 h Differenzierung konnte sogar eine Abnahme auf 0,2 ermittelt werden.

Durch dieses Experiment wurde das Ergebnis des Bioassays bezüglich *Slon2* und Chivosazolproduktion bestätigt. Trotz unterschiedlicher Bedingungen konnte auch hier nachgewiesen werden, dass *Slon2* einen Defekt in der Produktion von Chivosazol aufweist. Nach den Ergebnissen der Real-time RT-PCR ist dieser Defekt schon auf dem Niveau der Genexpression vorhanden.

3.3.3.4 Degradation von Cellulose durch *Slon1-5*

Ebenso wie bei *SasgA* galt es auch bei den *Slon*-Mutanten zu testen, ob diese durch ihren jeweiligen Defekt in der morphologischen Differenzierung nicht mehr in der Lage sind, Cellulose zu degradieren. Deshalb wurden auch diese Mutanten hinsichtlich der Degradation von Cellulose untersucht. Der Versuch wurde wie unter 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt.

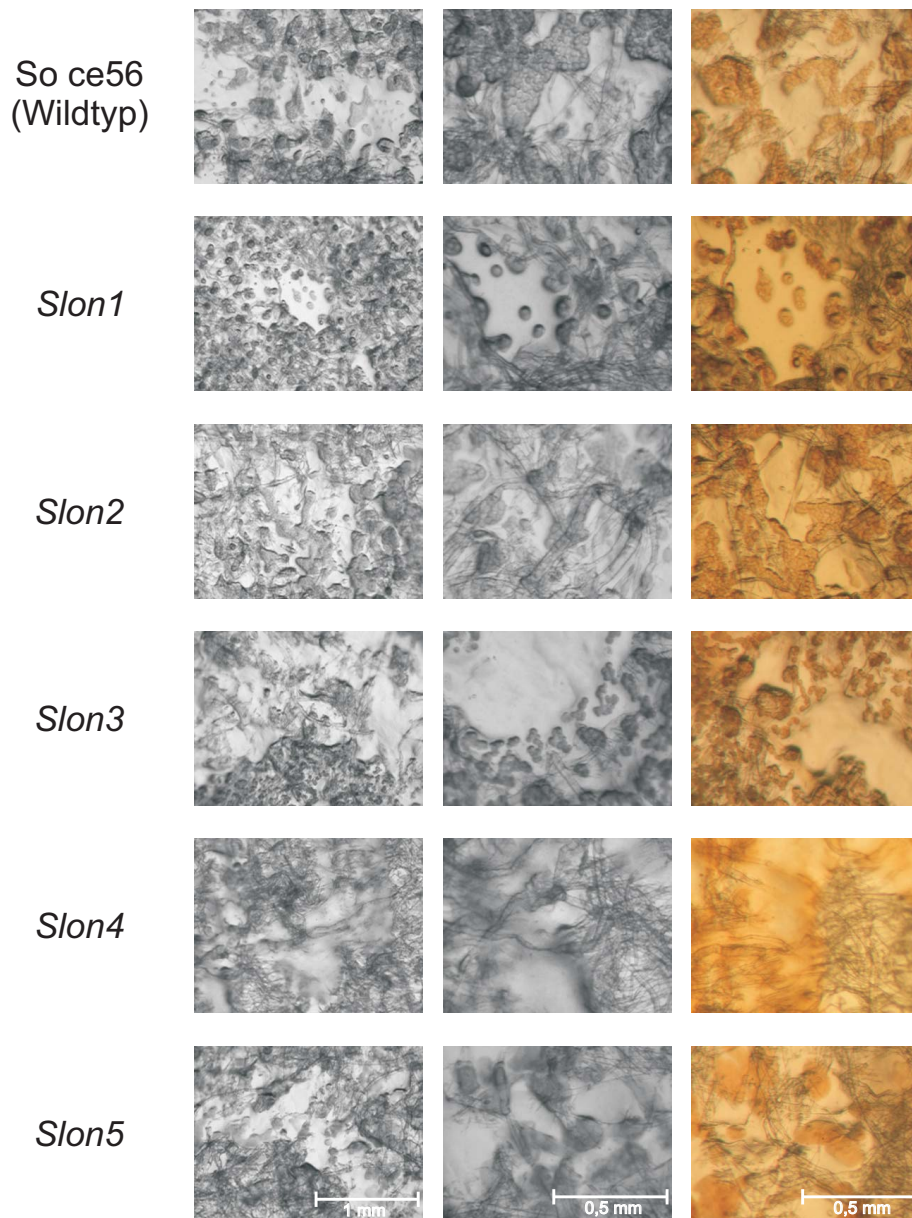


Abbildung 3.21: Tropfversuch mit So ce56 (Wildtyp) und *Slon1-5* auf Cellulose. Die Celluloseplättchen wurde für diesen Versuch auf P-Diff-Agar gelegt. Die Platten wurden für insgesamt 10 Tage bei 32 °C inkubiert. Die hellen Stellen markieren den Bereich der Cellulosezersetzung durch den jeweiligen Stamm. Die dunklen Bereiche kennzeichnen die noch vorhandene Schicht an Cellulose. Des Weiteren kann man bei genauerer Betrachtung sowohl bei So ce56 (Wildtyp) als auch bei den verschiedenen *Slon*-Mutanten Fruchtkörper-„Ansätze“ erkennen.

Abbildung 3.21 zeigt die Ergebnisse des Versuches. Wie auch für *SasgA* beschrieben, konnten in diesem Fall bei allen Stämmen nach etwa 10 Tagen Inkubation helle Stellen auf dem dunklen Cellulose-Papier ausgemacht werden. Unter dem Stereoskop konnten an diesen Stellen keine Cellulose-Fasern mehr gefunden werden, während an den Übergängen deutlich zersetzte Cellulose-Fasern ausgemacht wurden. Somit sind *Slon1-5* wie der Wildtyp in der Lage, Cellulose zu zersetzen.

3.3.4 Bestimmung der relativen Expression der *lon*- Gene von *S. cellulorum* So ce56

Von *lonD* bzw. *bsgA* aus *M. xanthus* ist bekannt, dass es sowohl während der vegetativen Phase als auch während der Differenzierung exprimiert wird, wobei sich unter Differenzierungsbedingungen die Expression von *lonD* graduell erhöht (Gill & Bornemann 1988).

Um eine Aussage über die Expression der verschiedenen *lon*-Gene in So ce56 treffen zu können, wurde die relative Expression anhand einer Real-time RT-PCR unter Verwendung der in Tabelle 3.7 aufgelisteten *primer* für jedes *lon*-Gen bestimmt. Die Isolierung der Gesamt-RNA sowie die Real-time RT-PCR wurde wie unter 2.4.4 und 2.6.4 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 3.7: Für die Real-time RT-PCR verwendete *primer* und Fragmentgröße des amplifizierten Fragmentes

zu untersuchendes Gen	<i>primer</i>	Fragmentgröße
<i>lon1</i>	SocebsgArt+/SocebsgArt-	309 bp
<i>lon2</i>	socelon2+/lon2rt-	189 bp
<i>lon3</i>	socelon3+/lon3rt-	201 bp
<i>lon4</i>	socelon4+/lon4rt-	180 bp
<i>lon5</i>	socelon5+/lon5rt-	189 bp

Als Referenz wurde 16S rRNA verwendet, deren Expressionslevel anhand der Real-time RT-PCR-Daten überprüft wurden. Die relative Expression zum Zeitpunkt 0 h wurde als 1 definiert und die jeweilige *lon*-Expression an den folgenden zwei Zeitpunkten (3 h und 6 h Differenzierung) dazu in Relation gesetzt.

Die Ergebnisse der Real-time RT-PCR, die in Abbildung 3.22 graphisch dargestellt sind, ergaben bis auf eine Ausnahme eine Abnahme der relativen Expression der *lon*-Gene unter Differenzierungsbedingungen.

Für die relative Expression von *lon1* unter Differenzierungsbedingungen wurde nach 3 h Differenzierung eine Abnahme auf 0,2 in Relation zum Zeitpunkt t_0 festgestellt. Nach 6 h Differenzierung konnte jedoch wieder eine Zunahme der relativen Expression auf 0,7 ermittelt werden. Bei der ermittelten relativen Expression von *lon2* konnte Gegensätzliches beobachtet werden. Hier kam es nach 3 h Differenzierung zunächst zu einer Abnahme der relativen Expression auf 0,5. Nach weiteren 3 h Differenzierung konnte eine weitere Abnahme der relativen Expression auf 0,3 ermittelt werden. Die relative Expression von *lon3* zeigte nach 3 h Differenzierung eine Abnahme auf 0,4 und nach 6 h Differenzierung wiederum eine Zunahme auf 0,6. Bei der Auswertung der relativen Expression für *lon4* konnte eine Abnahme auf 0,2 nach 3 h Differenzierung und wiederum eine geringe Zunahme auf 0,3 nach 6 h Differenzierung festgestellt werden. Die geringste Abnahme in der relativen Expression, gefolgt von einer minimalen Zunahme, konnte für *lon5* verzeichnet werden. Hier kam es nach 3 h Differenzierung zu einer geringfügigen Abnahme der

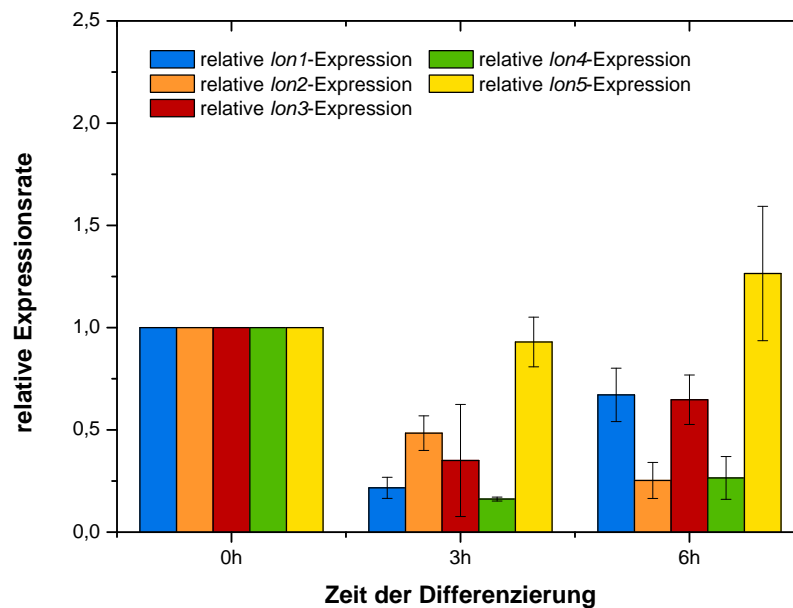


Abbildung 3.22: Bestimmung der relativen Expression der *lon*-Gene aus *S. cellulosum* So ce56 während der Differenzierung durch Real-time RT-PCR. Zu den angegebenen Zeitpunkten (0 h, 3 h und 6 h Differenzierung) wurde die Gesamt-RNA isoliert. Die Expression zum Zeitpunkt 0 h wurde als 1 definiert und die Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten dazu in Relation gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an. Als Referenz wurde 16S rRNA verwendet.

relativen Expression auf 0,9, nach 6 h unter Differenzierungsbedingungen jedoch wieder zu einer Zunahme auf 1,3.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass außer für *lon5* eine Abnahme der relativen Expressionsrate unter Differenzierungsbedingungen zu verzeichnen war und die Gene *lon1*, *lon2*, *lon3* und *lon4* unter Differenzierungsbedingungen einer negativen Regulation unterliegen. Die leichten Änderungen in der relativen Genexpression für *lon5* können in Anbetracht der Fehlerbalken als nicht signifikant eingestuft werden, wodurch die Expression dieses Gens als konstitutiv bezeichnet werden kann.

3.4 Identifizierung potenzieller Substrate von Lon1 und Lon2 aus *S. cellulosum* So ce56

Intrazelluläre Protein-Degradation ist einerseits essentiell zur Kontrolle der Level an regulatorischen Schlüsselproteinen, andererseits aber auch zur Eliminierung von abnormen und missgefalteten Proteinen. In allen Organismen wird dies durch das Vorhandensein von ATP-abhängigen Proteasen gewährleistet, welche unter Energieverbrauch durch die Hydrolyse von ATP eine zentrale Funktion bei der Qualitätskontrolle und der Regulation zellulärer Prozesse ausüben.

In *E. coli* sind für die ATP-abhängige Degradation cytosolischer Proteine die Proteasen Lon und ClpP verantwortlich (Chandu & Nandi 2004).

3.4.1 Präparation von Proteinfractionen von *Slon1* und *Slon2* mit nachfolgender MALDI-TOF-Analyse

Zur Identifizierung potenzieller Substrate der Lon-Proteasen aus So ce56 wurden Proteinextrakte von So ce56, *Slon1* und *Slon2* durch Proteinfractionierung (siehe 2.8.5) aufgetrennt und anhand SDS-PAGE analysiert. Die Proteinfractionierung diente hierbei zur Minimierung der Proteine in den einzelnen Fraktionen und besseren Auswertbarkeit der SDS-Gele. Die Versuche bezüglich der Identifizierung potenzieller Substrate von Lon-Proteasen konnten zu diesem Zeitpunkt nur

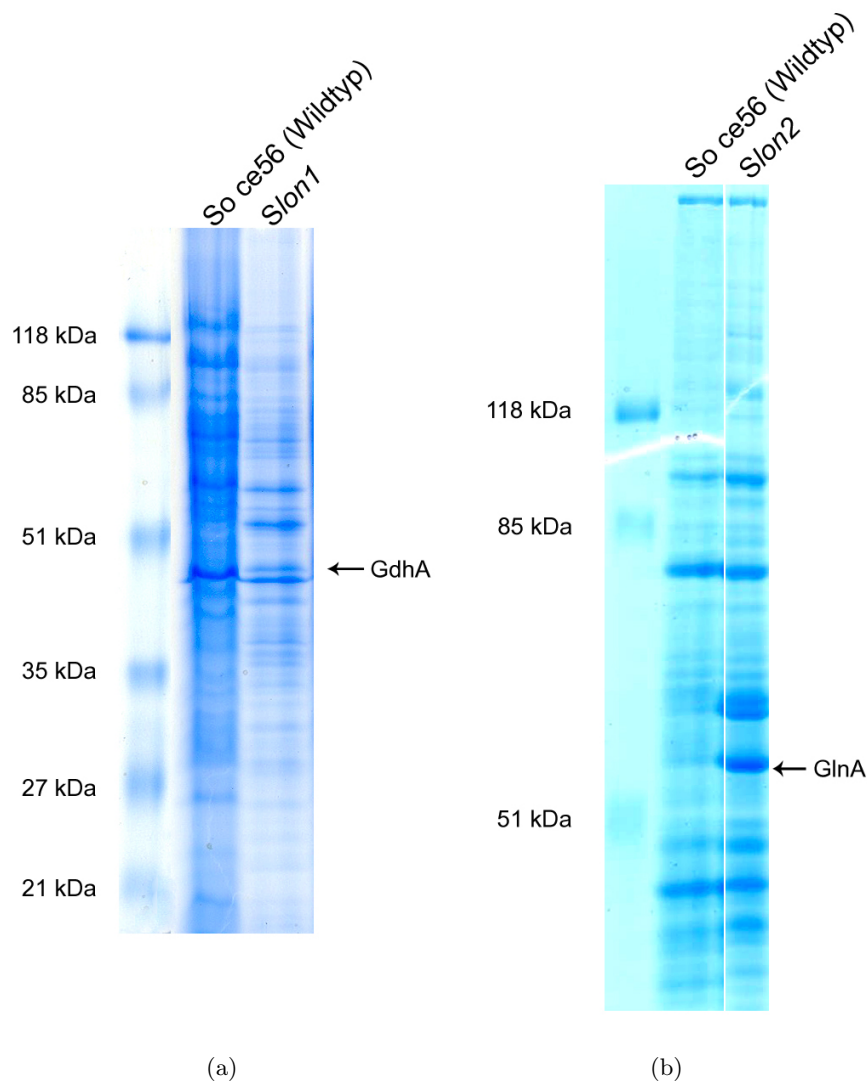


Abbildung 3.23: Ergebnis der SDS-PAGE der Präparation der „Membran“-Fraktion von *Slon1* (a) und der cytoplasmatischen Fraktion von *Slon2* (b). Die Kulturen für die Proteinfractionierung wurden in SMA-Medium angeimpft und bis Erreichen der exponentiellen Phase bei 32 °C und 180 rpm inkubiert. Die Fraktionierung erfolgte wie unter 2.8.5 beschrieben. Anschließend wurden die verschiedenen Fraktionen anhand SDS-PAGE aufgetrennt. Abbildung (a) zeigt ein 12 %iges SDS-Gel (60 µg Protein), Abbildung (b) zeigt das Ergebnis eines 15 %igen SDS-Geles (30 µg Protein). Die Proteine wurden mit *Coomassie® brilliant blue G 250* angefärbt. Neben den namentlich markierten Proteinen konnten keine weiteren Proteine per MALDI-TOF identifiziert werden.

mit Lon1 und Lon2 erfolgen, da weitere *lon*-Mutanten in So ce56 noch nicht vorlagen.

Für die Proteinfractionierung wurden die Zellen von So ce56 (Wildtyp), *Slon1* und *Slon2* in Sma-Medium bis Erreichen der exponentiellen Phase angezogen. Bei Erreichen der exponentiellen Phase wurden 30 ml der jeweiligen Kultur bei 10.000 rpm und 4 °C für 10 min sedimentiert. Mit dem Zellsediment wurde wie unter 2.8.5 beschrieben weiter verfahren.

Die verschiedenen Fraktionen wurden auf einem 12 %igen beziehungsweise 15 %igen SDS-Gel analysiert und verglichen. Ausschlaggebend waren dabei die Unterschiede im Bandenmuster zwischen den Mutanten und dem Wildtyp. Die Proteine wurden mit *Coomassie*[®] *brilliant blue G 250* angefärbt, da eventuelle Unterschiede im Bandenmuster durch MALDI-TOF-Analysen weiter untersucht werden sollten.

Die Ergebnisse der Fraktionierung und Auftrennung der Proteinfractionen von So ce56, *Slon1* und *Slon2* anhand von SDS-Gelen sind in Abbildung 3.23 gezeigt. In Abbildung 3.23(a) wird das Ergebnis der 15 %igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung der „Membran“-Fraktion von So ce56 im Vergleich zu *Slon1* gezeigt. Anhand der MALDI-TOF-Analysen ausgewählter Proteinbanden, welche in Bielefeld von Aysel Alici durchgeführt wurden, konnte ein Unterschied im Bandenmuster zwischen Wildtyp und Mutante aufgeklärt werden. Weitere Proteine konnten nicht identifiziert werden. Die MALDI-TOF-Analyse der zusätzlichen Bande im Proteinmuster der Membran-Fraktion von *Slon1* ergab, dass in der exponentiellen Phase des Wachstums GdhA (Glutamat-Dehydrogenase $\hat{=}$ Sce6195) vermehrt in der Mutante vorliegt. Dies könnte damit einen möglichen Hinweis für das potenzielle und spezifische Substrat der Lon1-Protease in So ce56 darstellen. In diesem Fall wäre die Lon1-Protease dafür verantwortlich, dass GdhA im Laufe der exponentiellen Phase degradiert wird und nicht akkumuliert. In beiden Fällen wurden nur die stärksten Unterschiede im Bandenmuster berücksichtigt und anhand von MALDI-TOF-Analysen untersucht.

In Abbildung 3.23(b) ist das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der cytoplasmatischen Fraktionen von So ce56 und der Mutante *Slon2* abgebildet. Auch von diesem SDS-Gel wurden Unterschiede im Bandenmuster per MALDI-TOF-Analyse untersucht. Anhand dieser Analyse konnte in *Slon2* GlnA (Glutaminsynthetase $\hat{=}$ Sce7210) identifiziert werden, welches im Vergleich mit der GlnA-Bande des Wildtyps vermehrt in der Mutante vorliegt.

3.4.2 Heparinsäule zur Konzentrierung bzw. Isolierung DNA-bindender Proteine

Ebenso wie das zuvor beschriebene Verfahren wurde auch die Heparinsäule dafür verwendet, um mögliche Unterschiede im Proteom zwischen Wildtyp und Mutanten zu identifizieren. Durch die Verwendung einer Heparinsäule besteht die Möglichkeit, putative DNA-bindende Proteine zu isolieren.

Für dieses Experiment wurden die Zellen in Sma-Medium angeimpft und bis Erreichen der stationären Phase bei 32 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden wie unter 2.11.1.1 beschrieben durchgeführt. Es wurden 1 ml Fraktionen mit einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ gesammelt. Der an der Säule angelegte Gradient verlief von 0 M bis 2 M NaCl in Puffer B.

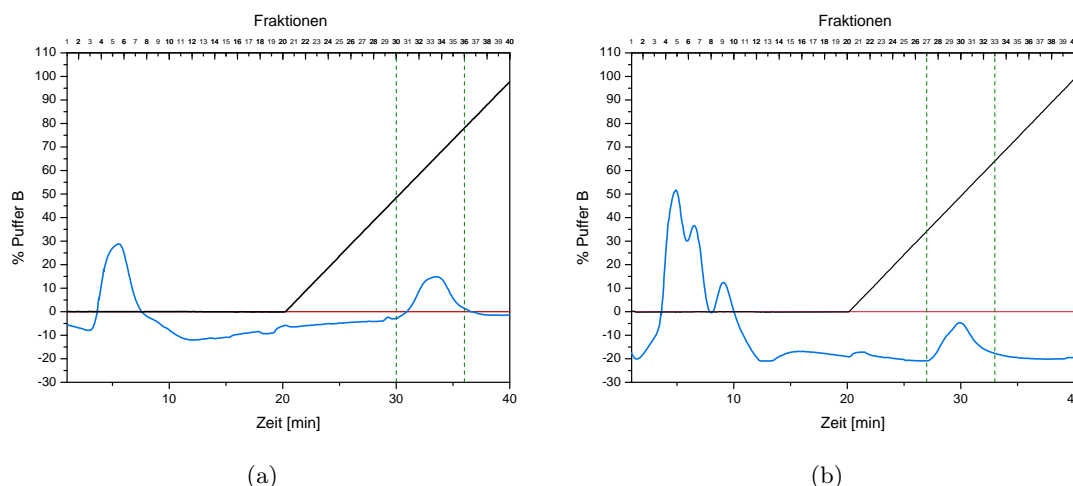


Abbildung 3.24: Elutionsprofile der Heparinsäule mit So ce56-Extrakt (a) und *Slon2*-Extrakt (b). Die blaue Kurve stellt das Elutionsprofil dar. Der grün eingegrenzte Bereich zeigt die proteinhaltigen Elutionsfraktionen, welche vereinigt und später anhand SDS-PAGE analysiert wurden.

In Abbildung 3.24 sind die Elutionsprofile beider Ansätze abgebildet. Der mit grün markierte Bereich der Fraktionen wurde jeweils zusammengefasst und weiter verwendet. Die Elution der Proteine erfolgte im Fall des So ce56-Extraktes bei 1,1 M bis 1,6 M NaCl, während die Elution der Proteine des *Slon2*-Extraktes schon im Bereich von 700 mM bis 1,2 M erfolgte.

Nach Abschluss des Laufes der Heparinsäule sollten die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben bestimmt werden. Da eine exakte Bestimmung der Proteinkonzentration auf Grund von zu geringen Proteinkonzentrationen nicht möglich war, wurden gleiche Volumina für die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung auf einem 8 %igen SDS-Gel eingesetzt. Die Proteinextrakte wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung noch mit Aceton (siehe 2.8.4) gefällt.

Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Abbildung 3.25 gezeigt. Da keine gleichen Mengen ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein) an Protein geladen wurden, konnte keine klare Aussage über die Unterschiede in der Intensität der einzelnen Proteinbande getroffen werden. Dennoch wurden deutliche Unterschiede im Bandenmuster zwischen Wildtyp und der Mutante *Slon2* per MALDI-TOF analysiert. Interessanterweise zeigte sich, dass im Gegensatz zum Wildtyp GlnB (P_{II} (sce7211)) in der Mutante *Slon2* vermehrt akkumuliert. Um das optische Ergebnis des Vergleiches der Intensität der Bandenmuster weiter zu verifizieren, wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Dies geschah mit Hilfe des von der Arbeitsgruppe Forchhammer gestellten anti-GlnB *E. coli* IgG Konjugats und erfolgte wie unter 3.4.2.1 beschrieben.

3.4.2.1 Verifizierung des Ergebnisses der MALDI-TOF-Analyse

Die Analyse der nach der Heparinsäule erhaltenen Proteinextrakte anhand SDS-PAGE und nachfolgender MALDI-TOF-Analyse ergaben, dass GlnB im Vergleich zum Wildtyp vermehrt in der Mutante *Slon2* vorlag. Damit konnte vermutet werden, dass es sich bei GlnB eventuell

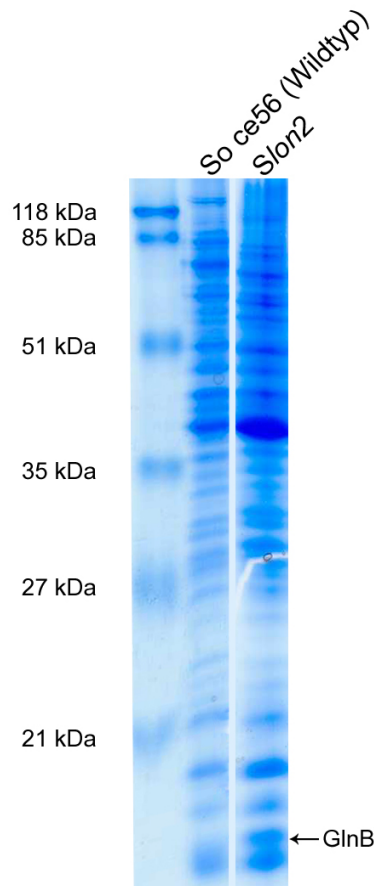


Abbildung 3.25: Ergebnis der 8 %igen SDS-PAGE der nach der Heparinsäule erhaltenen Überstände. Der Proteingehalt konnte leider nach der Heparinsäule nicht bestimmt werden und so wurden gleiche Mengen an Proteinextrakt mit Aceton gefällt und aufgetragen. Das nach der Fällung erhaltene Pellet wurde in 1x SDS-Auflaufspuffer resuspendiert. Die Proteine wurden nach Auftrennung im SDS-Gel mit *Coomassie® brilliant blue G 250* angefärbt.

um ein Substrat der Lon2-Protease in So ce56 handeln könnte. Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt.

Für den Versuch wurden die zuvor für die MALDI-TOF-Analyse verwendeten Proteinextrakte (siehe 3.4.2) genutzt. Des Weiteren wurden Zellen von So ce56, *Slon1* und *Slon2* über vier Tage in M-Diff-Medium angezogen, aufgebrochen und 30 μg des Proteinextraktes für die *Western Blot*-Analyse eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 2 μg Zellextrakt von in Minimalmedium angezogenen *E. coli*-Zellen (BL21) eingesetzt. Für die *Western Blot*-Analyse wurden GlnB-spezifische Antikörper von *E. coli* genutzt. Die verwendeten Medien sind jeweils Medien mit geringem Gehalt an Stickstoff. Das SMA-Medium ist ein synthetisches Medium mit definierten Mengen an Stickstoff, Kohlenstoff und Phosphat, während in dem M-Diff-Medium die Nährstoffe in Form von Soya-Pepton und Maltose auf ein Mindestmaß reduziert wurden.

In Abbildung 3.26 ist das Ergebnis der *Western Blot*-Analyse gezeigt. Entsprechend den Erwartungen konnte im Vergleich zum Wildtyp und *Slon1* in *Slon2* in beiden Medien eine stärkere Akkumulation von GlnB detektiert werden. Damit konnte die Vermutung, dass es sich bei GlnB um ein potenzielles Substrat der Lon2-Protease in So ce56 handelt, weiter bestätigt werden.

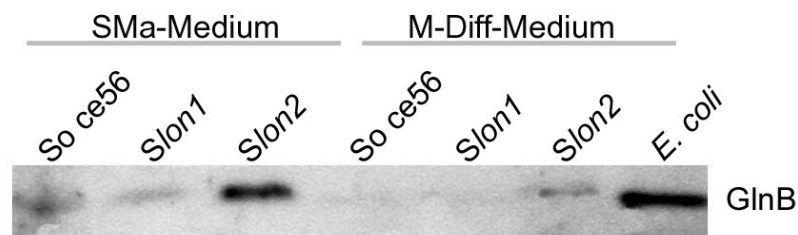


Abbildung 3.26: *Western Blot*-Analyse zur Verifizierung des MALDI-TOF-Ergebnisses mit den nach der Heparinsäule sowie aus M-Diff-Kulturen erhaltenen Proteinextrakten von So ce56, *Slon1* und *Slon2*. Von den aus M-Diff-Kulturen erhaltenen Proteinextrakten wurden 30 μg eingesetzt. Die Proben wurden mit 5x SDS-Auflaufspuffer gemischt und auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Für die *Western Blot*-Analyse wurde als erster Antikörper (1. AK) das anti-GlnB *E. coli* IgG Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Als 2. AK wurde das anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

Der Versuch wurde später unter Verwendung gleicher Proteinkonzentrationen wiederholt und bestätigte das vorherige Ergebnis.

3.5 P_{II} (GlnB) in *S. cellulosum* So ce56

Im Gegensatz zu *M. xanthus* zeichnet sich So ce56 durch das Vorhandensein des *glnB*-Genes aus, welches GlnB bzw. das Signaltransduktionsprotein P_{II} kodiert. Da *S. cellulosum* bisher der einzige Vertreter der Myxobakterien ist, welcher ein *glnB*-Gen aufweist, ist wenig bis gar nichts über die Rolle von P_{II} in Myxobakterien bekannt.

In der Koordination von Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus spielen die Proteine aus der P_{II} -Familie eine bedeutsame Rolle (Forchhammer 2004). So wird z. B. in Cyanobakterien wie auch in Enterobakterien der Stickstoffmetabolismus von dem zentralen P_{II} -Protein kontrolliert und auf die Kohlenstoffassimilation abgestimmt. P_{II} -Proteine sind hochkonserviert und konnten gleichermaßen in Archaeen als auch in Eukaryonten und Prokaryonten gefunden werden (Forchhammer 2004). Das bekannteste und am Besten untersuchte P_{II} -System stammt aus *E. coli*.

3.5.1 Die *glnB*- Region im Genom von *S. cellulosum* So ce56

Im Genom von So ce56 konnten Gene identifiziert werden, deren Genprodukte in vielen anderen Bakterien eine wichtige Rolle im Stickstoffmetabolismus spielen: *glnB* (*sce7211*), *glnA* (*sce7210*), *glnD* (*sce3141*) und *glnE* (*sce1766*). Im Gegensatz dazu fehlen im Genom von *M. xanthus* diese entscheidenden Gene (Quelle: GenDB).

Mit Hilfe der *Biology workbench* 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu>) wurden GlnB-Orthologe mit denen aus So ce56 unter Verwendung einer ClustalW-Analyse verglichen. Die phylogenetische Analyse verschiedener GlnB-Orthologe in Bezug zu GlnB (P_{II}) aus So ce56 (siehe Abb. 3.27)

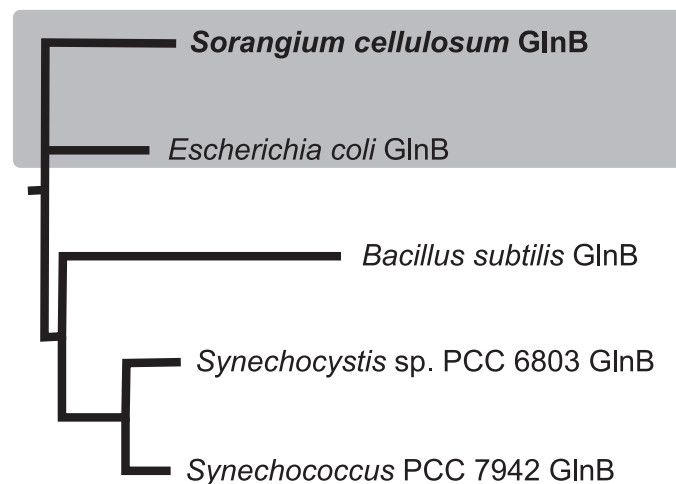


Abbildung 3.27: Phylogenetische Analyse mit den Aminosäuresequenzen ausgewählter *P_{II}*-Proteine basierend auf einer *ClustalW*-Analyse (*SDSC Biology workbench 3.2* (Higgins et al. 1992, Thompson et al. 1994)). Gruppen an Orthologen sind farblich (weiß; grau) voneinander abgegrenzt. GlnB von So ce56 weist einen hohen Verwandtschaftsgrad zu GlnB von *E. coli* auf.

zeigt einen hohen Verwandtschaftsgrad zwischen GlnB aus So ce56 und GlnB aus *E. coli*. Der Vergleich der Proteinsequenzen zeigt, dass alle GlnB-Proteine eine große Homologie zueinander aufweisen. In Abbildung 3.28 ist der Vergleich der Proteinsequenzen zu sehen. Die Homologien (Identität) sind der Tabelle 3.8 zu entnehmen.

Um die genetische Organisation der *glnB*-Region aus So ce56 und *E. coli* miteinander zu

GlnB (So ce56)	----	MKKVEA	I	I	K	P	F	K	L	D	E	V	K	D	A	L	A	E	V	G	I	Q	G	M	T	V	T	E	V	K	G	F	G	R	T	G	G	K	K	E	V	Y								
GlnB (E. coli)	----	MKKIDA	I	I	K	P	F	K	L	D	D	V	R	E	A	L	A	E	V	G	I	T	G	M	T	V	T	E	V	K	G	F	G	R	Q	K	G	H	T	E	L	Y								
GlnB (B. subtilis)	MSGQ	M	F	K	V	E	I	V	T	R	P	A	N	F	E	K	L	K	Q	E	L	G	K	I	G	V	T	S	L	T	F	S	N	V	H	G	C	G	L	Q	K	A	H	T	E	L	Y			
GlnB (Synechocystis)	----	MKKVEA	I	I	R	P	F	K	L	D	E	V	K	I	A	L	V	N	A	G	I	V	G	M	T	V	S	E	V	R	G	F	G	R	Q	K	G	Q	T	E	R	Y								
GlnB (Synechococcus)	----	MKKIEA	I	I	R	P	F	K	L	D	E	V	K	I	A	L	V	N	A	G	I	V	G	M	T	V	S	E	V	R	G	F	G	R	Q	K	G	Q	T	E	R	Y								
GlnB (So ce56)		RG	A	T	V	V	D	F	V	P	K	V	K	V	D	I	V	V	P	D	S	M	V	S	D	V	I	D	A	I	E	K	S	A	K	T	G	R	I	G	D	G	K	I	F	V	V	P	V	
GlnB (E. coli)		RG	A	T	V	V	D	F	L	P	K	V	K	I	E	I	V	V	P	D	D	I	V	D	T	C	V	D	T	I	I	R	T	A	Q	T	G	K	I	G	D	G	K	I	F	V	F	D	V	
GlnB (B. subtilis)		RG	V	K	I	E	S	N	V	Y	E	R	L	K	I	E	I	V	V	S	K	V	P	V	D	Q	V	T	E	T	A	K	R	V	L	K	T	G	S	P	G	D	G	K	I	F	V	Y	E	I
GlnB (Synechocystis)		RG	E	T	V	E	F	L	Q	K	L	K	I	E	I	V	D	E	G	Q	V	D	M	V	D	K	L	V	S	A	A	R	T	G	E	I	G	D	G	K	I	F	I	S	P	V				
GlnB (Synechococcus)		RG	E	T	V	E	F	L	Q	K	L	K	I	E	I	V	E	D	A	Q	V	D	T	V	I	D	K	I	V	A	A	A	R	T	G	E	I	G	D	G	K	I	F	V	S	P	V			
GlnB (So ce56)		EE	A	V	I	R	T	G	E	R	G	E	D	A	I																																			
GlnB (E. coli)		AR	V	I	R	I	R	T	G	E	E	D	D	A	I																																			
GlnB (B. subtilis)		S	N	T	I	N	I	R	T	G	E	E	G	P	E	A	L																																	
GlnB (Synechocystis)		D	S	V	V	I	R	T	G	E	K	D	T	E	A	I																																		
GlnB (Synechococcus)		D	Q	T	I	R	I	R	T	G	E	K	N	A	D	A	I																																	

Abbildung 3.28: Vergleich der GlnB-Aminosäuresequenzen aus So ce56, *E. coli*, *Synechocystis* sp PCC 6803 und *Synechococcus elongatus* sp PCC 7942. Der Vergleich beginnt am N-terminalen Ende. In allen vier Organismen identische Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind blau markiert. Die beiden für die Modifizierung wichtigen Aminosäuren sind farblich gekennzeichnet. Farbe grün markiert das Serin 49, während gelb das Tyrosin 51 markiert. Beide Aminosäuren konnten in GlnB aus So ce56 gefunden werden.

Tabelle 3.8: Homologien der GlnB-homologen Proteine aus *E. coli*, *Synechocystis* sp PCC 6803 und *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 im Vergleich zu GlnB aus So ce56. Abkürzung aa = *amino acids*.

GlnB-Orthologe	Länge	Identität zu GlnB (So ce56)
GlnB (<i>E. coli</i>)	112 aa	65,2%
GlnB (<i>B. subtilis</i>)	116 aa	33,6%
GlnB (<i>Synechocystis</i> sp PCC 6803)	112 aa	60,7%
GlnB (<i>Synechococcus elongatus</i> sp. PCC 7942)	112 aa	63,4%

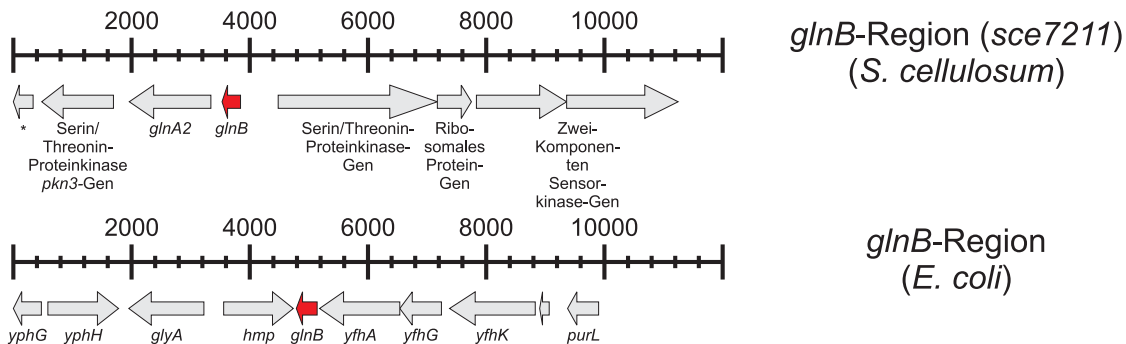


Abbildung 3.29: Genetische Organisation der *glnB*-Region von So ce56 und *E. coli*. Die Bezeichnung und Zuordnung der Gene wurde direkt aus den Genomen übertragen. Das *glnB*-Gen ist rot dargestellt. Die Genregionen sind maßstabsgetreu dargestellt.

vergleichen, wurden diese aus den Genomen maßstabsgetreu übernommen (Abb. 3.29). Bei dem Vergleich beider Regionen fiel auf, dass keine großen Übereinstimmungen in der genetischen Organisation zu finden sind.

3.5.2 Effekt verschiedener Kohlenstoffquellen auf die GlnB-Akkumulation

Für die bisherigen Untersuchungen wurden die Kulturen in SMa-Medium angezogen. Dieses wurde verwendet, da die Produktion von Chivosazol in S-Medium mit der Kohlenstoffquelle Mannose am stärksten ist (siehe Abb. 3.30). Dies gilt ebenso für Etnangien (Daten nicht gezeigt.) Da für die weiteren Untersuchungen hinsichtlich P_{II} die Bedeutung der Sekundärmetabolitproduktion zunächst nicht relevant erschien, wurde über Alternativen für die doch sehr teure Kohlenstoffquelle Mannose nachgedacht. Als guter Ersatz erschien Maltose, da in SM-Medium (S-Medium mit 1 % Maltose) ein gutes Wachstum zu verzeichnen war. Zu erwähnen sei jedoch, dass in diesem Medium die Sekundärmetabolitproduktion drastisch reduziert ist (Abb. 3.30).

Um für weitere Untersuchungen die Kohlenstoffquelle Maltose einsetzen zu können, sollte zunächst geklärt werden, ob unter diesen veränderten Bedingungen GlnB wiederum in *Slon2*

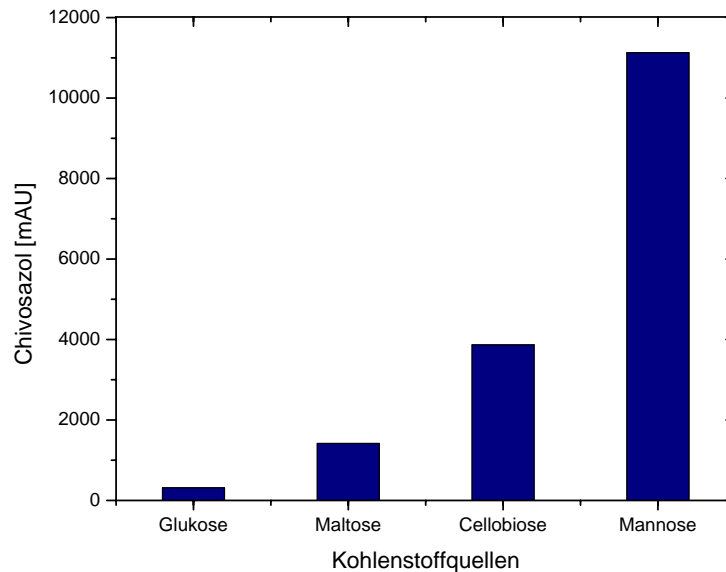


Abbildung 3.30: Produktion von Chivosazol in S-Medium in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle (1 %) (Müller & Gerth 2005).

akkumuliert. Dafür wurden Zellextrakte aus der frühen stationären Phase (250 Klett) von SM- bzw. SMa-Kulturen von So ce56 und *Slon2* hergestellt. Je 30 μg Protein wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel geladen. Als Positivkontrolle wurden 2 μg von in Minimalmedium angezogen *E. coli*-Zellen (BL21) eingesetzt. Anschließend erfolgte eine *Western Blot*-Analyse. Das Ergebnis des *Western blots* ist in Abbildung 3.31 gezeigt.

Im Vergleich von So ce56 und *Slon2* konnte festgestellt werden, dass wie bereits beschrieben in der Mutante GlnB in höheren Konzentrationen vorlag. Vergleicht man nun noch die verschiedenen Anzuchtbedingungen (SM- bzw. SMa-Medium) miteinander, so ist deutlich erkennbar, dass die Wahl der Kohlenstoffquelle keinesfalls einen Einfluss auf die GlnB-Akkumulation in *Slon2* hatte. Somit wurde für weitere Untersuchungen an Stelle der Kohlenstoffquelle Mannose (SMa-Medium) Maltose (SM-Medium) verwendet.

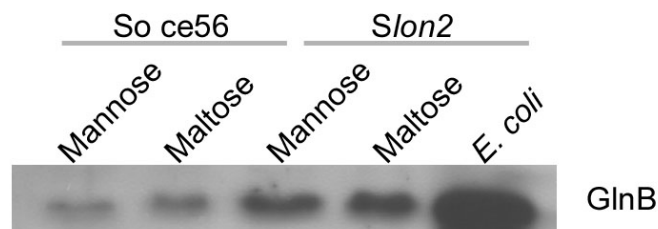


Abbildung 3.31: Einfluss verschiedener C-Quellen auf die Akkumulation von GlnB. *Western Blot*-Analyse von aus SM- bzw. SMa-Kulturen gewonnenen Proteinextrakten von So ce56 und *Slon2* aus der stationären Phase. Die Proben (30 μg) wurden mit 5x SDS-Auftragspuffer gemischt und auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Für die *Western Blot*-Analyse wurde als erster Antikörper (1. AK) das anti-GlnB *E. coli* IgG Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Als 2. AK wurde das anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

3.5.3 Modifikation des P_{II} -Proteins aus So ce56 durch Phosphorylierung

Die Signalwahrnehmung durch P_{II} -Proteine bezüglich des zellulären Status basiert auf der Bindung von ATP und α -Ketoglutarat (Kamberov et al. 1995, Forchhammer & Hedler 1997, Jiang et al. 1998a). Durch die Bindung der Effektormoleküle können die P_{II} -Proteine an einem Aminosäurerest an der Spitze des T-loops reversibel modifiziert werden. Bisher sind drei unterschiedliche Arten der Modifikation bekannt:

- In Proteobakterien wird das Tyrosin 51 uridyliert (Son & Rhee 1987).
- In Aktinobakterien wird ebenfalls das Tyrosin 51 modifiziert, jedoch in Form einer Adenylierung (Strösser et al. 2004).
- In Cyanobakterien wird der Serinrest 49 phosphoryliert (Forchhammer & Tandeau de Marsac 1995).

Sowohl der Tyrosinrest 51 als auch der Serinrest 49 sind im P_{II} -Protein von So ce56 vorhanden (siehe Abb. 3.28), wodurch zunächst beide Modifikationen möglich erschienen.

Die Frage nach der Art der Modifikation des P_{II} -Proteins aus So ce56 sollte anhand eines Demodifikationsassays geklärt werden. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die verschiedenen Isoformen des P_{II} -Proteins, von nicht modifiziert bis 3fach modifiziert, auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladung in einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese voneinander getrennt werden können (Forchhammer & Tandeau de Marsac 1994).

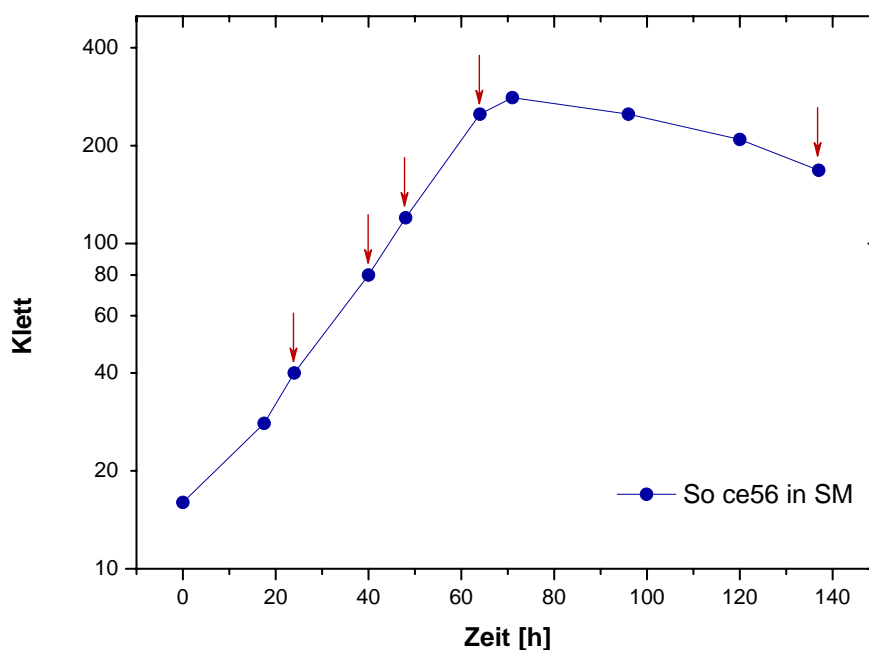


Abbildung 3.32: Wachstum von So ce56 in SM-Medium (0,5 % Asparagin; 1 % Maltose). Die roten Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Probenentnahmen für den nachfolgenden Demodifikationsassay. Das Wachstum wurde anhand von Klettmessungen verfolgt. 40 Klett = frühe exp. Phase; 80 Klett = mittlere exp. Phase; 120 Klett = späte exp. Phase und 250 Klett = frühe stationäre Phase.

Für den Demodifikationsassay wurde So ce56 in SM-Medium angezogen (siehe Abb. 3.32) und zu bestimmten Zeitpunkten wurden der Kultur Proben entnommen. Es erfolgte ein Zellaufschluss mittels RiboLyser. Dabei wurden Extrakte aus der frühen exponentiellen Phase (etwa 40 Klett), der mittleren exponentiellen Phase (etwa 80 Klett), aus der späten exponentiellen Phase (etwa 120 Klett) sowie aus der frühen stationären Phase (etwa 250 Klett) und späten stationären Phase hinsichtlich der Modifikation des P_{II} -Proteins aus So ce56 untersucht.

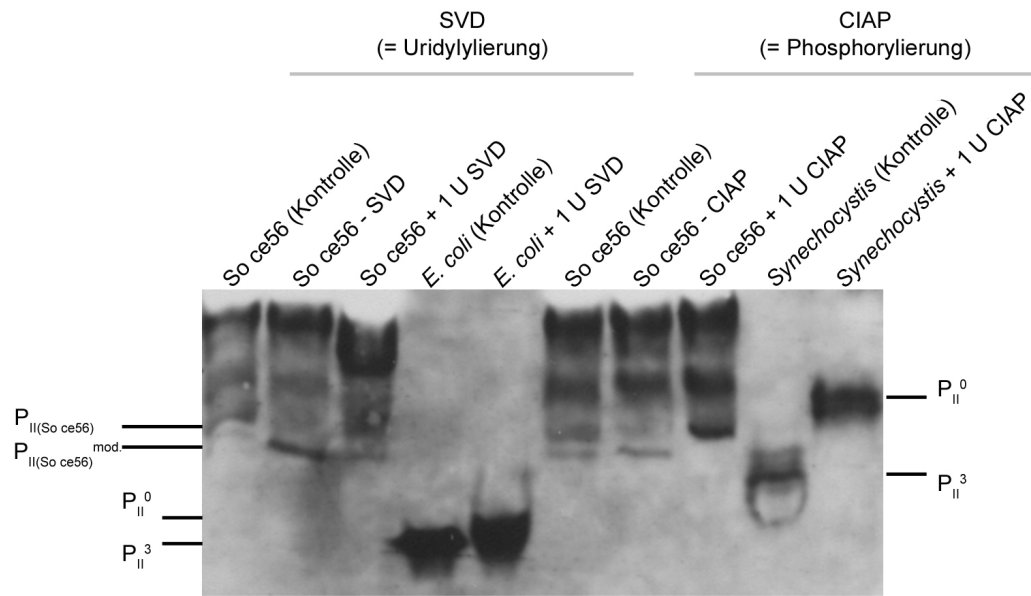
Für den enzymatischen Demodifikationsassay des P_{II} -Proteins wurden zwei unterschiedliche Enzyme verwendet. Zum Nachweis einer Modifikation von P_{II} in Form einer Uridylylierung wurde *snake venom* Phosphodiesterase (USB) verwendet. Die Phosphodiesterase demodifiziert nukleotidylierte Proteine (uridylierte bzw. adenylierte Proteine). Für den Nachweis einer vorliegenden Phosphorylierung wurde die alkalische Phosphatase (MBI; Fermentas) eingesetzt, welche Phosphoproteine demodifiziert. In beiden Fällen sollte sich ein positives Ergebnis (Demodifikation) in Form eines *mobility shifts* zu einer langsameren Laufform in einer Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen zeigen.

Der Demodifikationsassay wurde wie unter 2.8.9 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten Extrakte von *E. coli* BL21 (Deuridylylierung) bzw. *Synechocystis* sp. PCC 6803 MPphA, die unter nährstofflimitierten Bedingungen angezogen wurden (+1 U SVD/CIAP). Für die Negativkontrollen wurde den Reaktionsansätzen kein Enzym zugegeben (- SVD/CIAP). Des Weiteren wurde als Kontrolle der nach Zellaufschluss erhaltene Proteinextrakt aufgetragen. Sowohl mit Enzym behandelte Proben als auch die unbehandelten Proben wurden für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden nach der Behandlung mit 2x Nativproben-Auftragspuffer versetzt. Anschließend wurde der P_{II} -Modifikationsstatus in einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese mit anschließendem *Western Blot* analysiert. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Abbildung 3.33 und 3.34 gezeigt. Der Modifikationsstatus von P_{II} aus Zellen der späten stationären Phase konnte nicht untersucht werden, da nur sehr geringe Mengen an Gesamtprotein nach dem Zellaufschluss vorlagen.

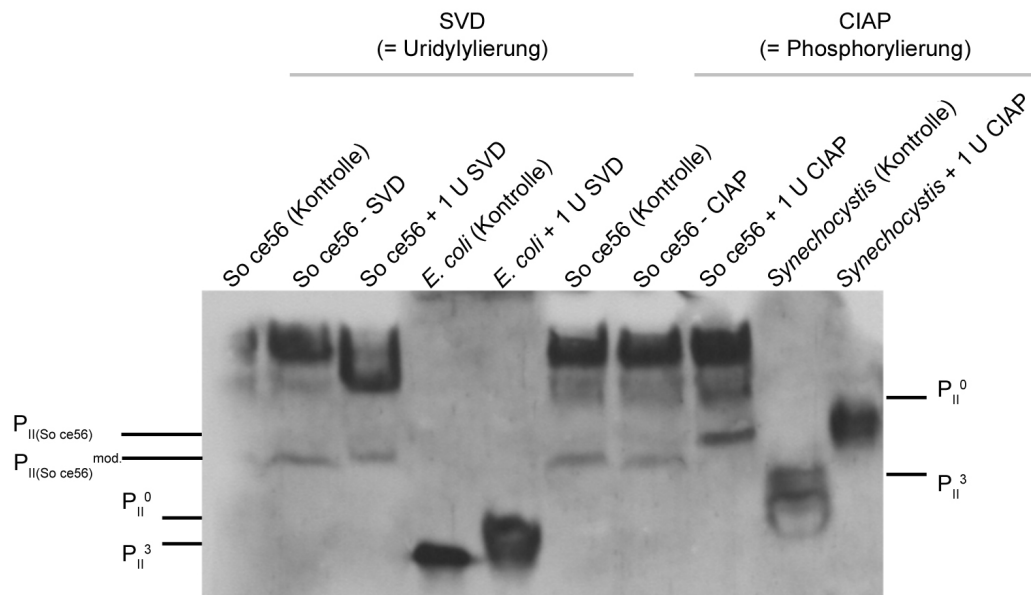
Bei allen vier Demodifikationsassays (40 Klett, 80 Klett, 120 Klett und 250 Klett) konnte anhand der Positivkontrollen gezeigt werden, dass die Demodifikation durch die Enzyme funktionierte. Beide Extrakte der Positivkontrollen zeigten vor Behandlung mit dem zugehörigen Enzym die hochmodifizierte bzw. 3 fach modifizierte Form von P_{II} (P_{II}^3). Nach Behandlung konnte ein deutlicher *mobility shift* zu einer langsamer laufenden Form von P_{II} detektiert werden (P_{II}^0).

Für das So ce56 P_{II} -Protein wurde mit Hilfe des Demodifikationsassays in allen vier untersuchten Wachstumsphasen eine Modifikation in Form einer Phosphorylierung nachgewiesen, da unter Zugabe von 1 U CIAP (alkalische Phosphatase) ein *mobility shift* zu einer langsamer laufenden Form von P_{II} beobachtet wurde. Nach Zugabe von 1 U SVD (*snake venom* Phosphodiesterase) konnte dagegen kein *mobility shift* beobachtet werden.

Es konnte für P_{II} aus So ce56 jedoch keine Auftrennung der verschiedenen phosphorylierten Isoformen des P_{II} -Proteins erreicht werden. Somit ist zu diesem Zeitpunkt nicht klar, ob die vorliegende phosphorylierte und unter nativen Bedingungen detektierte Form von P_{II} einer einfachen oder dreifachen Phosphorylierung zu Grunde liegt oder ob die Bedingungen bisher noch nicht richtig gewählt wurden.

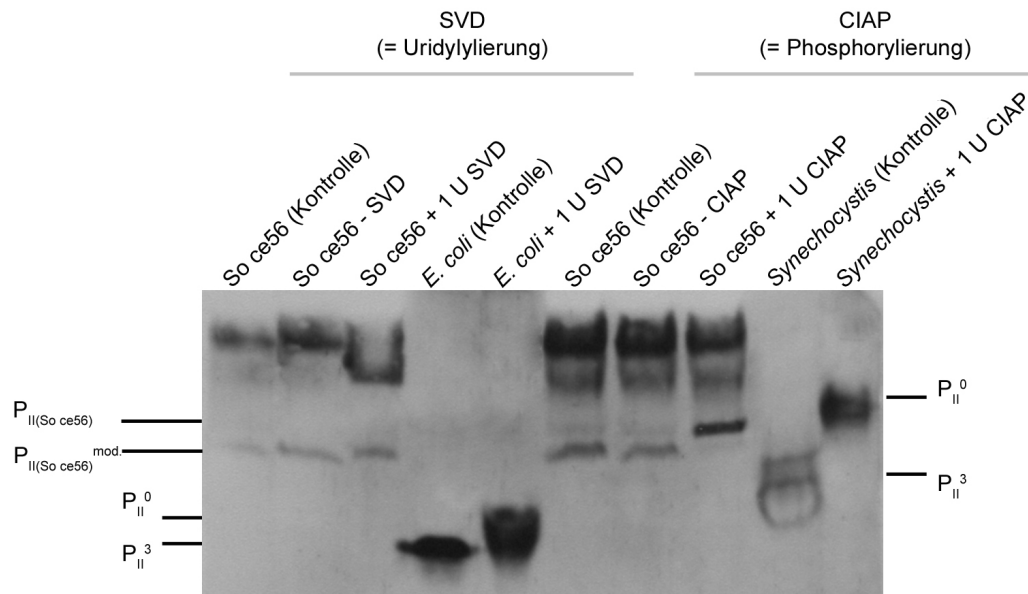


(a)

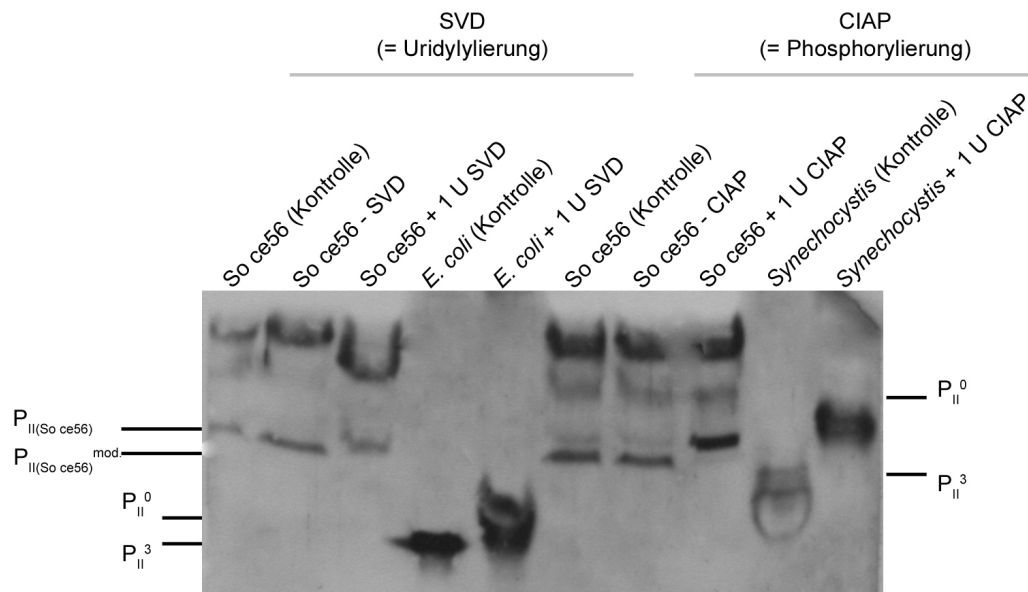


(b)

Abbildung 3.33: *in vitro* Demodifikation von modifiziertem P_{II} aus So ce56. (a) Ergebnis des Demodifikationsassays von P_{II} aus Zellen der frühen exponentiellen Phase (40 Klett). (b) Ergebnis des Demodifikationsassays von P_{II} aus Zellen der mittleren exponentiellen Phase (80 Klett). Für die *Western Blot*-Analyse wurde als erster Antikörper (1. AK) das anti-GlnB *E. coli* IgG Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Als 2. AK wurde das anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Für den *Western Blot* einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese wurde anstelle von PVDF-Membran, Nitrocellulose verwendet. SVD = *snake venom* Phosphodiesterase; CIAP = alkalische Phosphatase



(a)



(b)

Abbildung 3.34: *in vitro* Demodifikation von modifiziertem P_{II} aus So ce56. (a) Ergebnis des Demodifikationsassays von P_{II} aus Zellen der späten exponentiellen Phase (120 Klett). (b) Ergebnis des Demodifikationsassays von P_{II} aus Zellen der frühen stationären Wachstumsphase (250 Klett). Für die *Western Blot*-Analyse wurde als erster Antikörper (1. AK) das anti-GlnB *E. coli* IgG Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Als 2. AK wurde das anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Für den *Western Blot* einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese wurde anstelle von PVDF-Membran, Nitrocellulose verwendet. SVD = *snake venom* Phosphodiesterase; CIAP = alkalische Phosphatase

3.5.3.1 Auswirkung der Stickstofflimitierung auf das Wachstum von So ce56 und *Slon2*

Anhand der Ergebnisse der GlnB-Akkumulation in *Slon2* unter stickstoffarmen Bedingungen konnte spekuliert werden, dass die Lon2-Protease möglicherweise eine Rolle im Stickstoffmetabolismus von So ce56 einnimmt. Daher war es von Interesse, das Wachstum von Wildtyp und Mutante mit noch geringeren Mengen an Stickstoff zu beobachten. Da Asparagin in diesem Medium als Stickstoffquelle genutzt wurde, wurde dessen Konzentration erniedrigt.

Für diesen Wachstumsversuch wurden zunächst Kulturen von So ce56 und *Slon2* in SM-Medium mit 0,5 % Asparagin, 0,25 % Asparagin und 0,05 % Asparagin auf einen Klettwert von ca. 20 bis 40 angeimpft. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von sechs Tagen durch Messung des Klettwertes beobachtet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.35 gezeigt.

Im Gegensatz zu vorherigen Wachstumsversuchen fiel auf, dass auch unter „normalen“ Stickstoffverhältnissen (SM-Medium mit 0,5% Asparagin) sowohl vom Wildtyp als auch von der Mutante ein schlechtes Wachstum zu verzeichnen war. Dies konnte wiederholt beobachtet werden. Im Verlauf von verschiedenen Wachstumsversuchen traten immer wieder Phasen auf, in denen So ce56 sehr gut bzw. schlecht wuchs. Worin diese Unterschiede im Wachstum zu unterschiedlichen Zeiten begründet liegen, konnte jedoch nicht geklärt werden. Das Phänomen trat jedoch auch in anderen Laboren auf (pers. Mitteilung O. Perlova). Im Vergleich beider Stämme, Wildtyp und Mutante, zeigten beide sowohl bei Wachstum unter „normalen“ Stickstoffkonzentrationen (SM-Medium mit 0,5 % Asparagin) als auch bei Wachstum mit geringfügig weniger Stickstoff (SM-Medium mit 0,25 % Asparagin) keine Unterschiede im Wachstum. Es scheint jedoch so, dass beide Stämme mit 0,25 % Asparagin gut wachsen können.

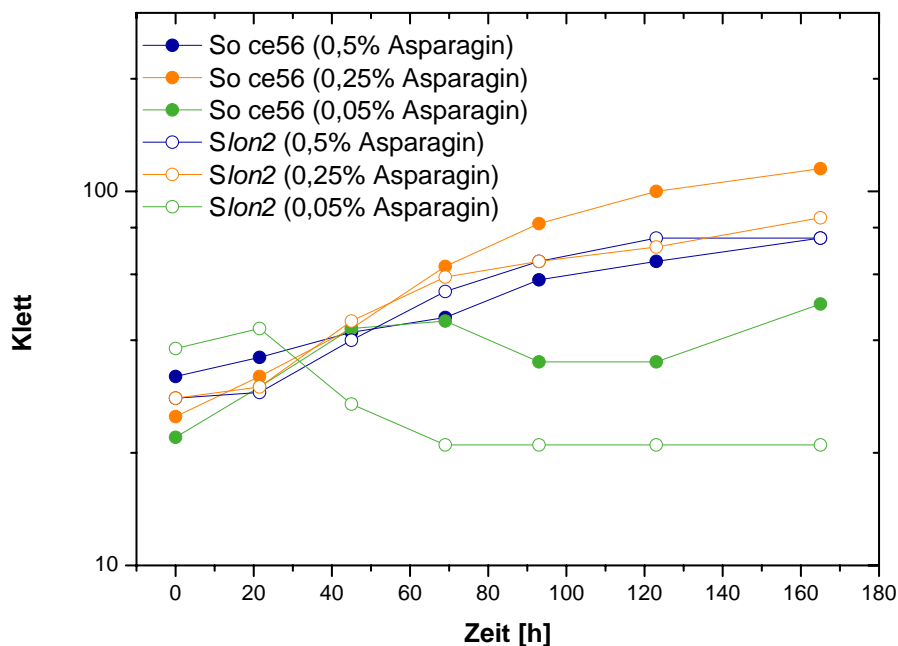


Abbildung 3.35: Vergleich des Wachstums von So ce56 und *Slon2* in SM-Medium mit unterschiedlichen Konzentration an Asparagin (N-Quelle). 0,5% Asparagin (blau) = 8 mM N; 0,25% Asparagin (orange) = 4 mM N; 0,05% Asparagin (grün) = 0,8 mM N.

Ein deutlicher Effekt zeigte sich bei Verwendung von nur 0,05% Asparagin in SM-Medium. Das Wachstum von So ce56 wurde jedoch nicht so stark davon beeinträchtigt, wie das für das Wachstum von *Slon2* der Fall war. Bei So ce56 trat erst nach etwa 80 h ein Wachstumsstopp ein. Bei der Mutante zeigte sich der Effekt der Stickstofflimitierung dramatischer. Schon nach etwa 20 h unter Stickstofflimitierung kam es bei *Slon2* zu einem Wachstumsstopp und schließlich zur Lyse der Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lon2-Protease eventuell eine Rolle im Stickstoffmetabolismus von So ce56 einnimmt.

KNO₃ als alternative Stickstoffquelle

Da Asparagin den Zellen sowohl als Stickstoffquelle als auch als Kohlenstoffquelle dienen kann, sollte ein weiterer Wachstumsversuch in SM-Medium mit einer reinen Stickstoffquelle Aufschluß darüber geben, inwieweit die Beeinflussung des Wachstums von *Slon2* bei geringen Mengen an Asparagin tatsächlich auf die Stickstofflimitierung zurückzuführen ist. Daraufhin wurde zunächst ein Versuch unternommen, in dem das Wachstum von So ce56 in SM-Medium mit unterschiedlichen Stickstoffquellen verglichen wurde. Als alternative Stickstoffquellen neben Asparagin wurden Harnstoff, KNO₃ und NH₄Cl eingesetzt. Für den direkten Vergleich wurde von Asparagin wie auch von den anderen Stickstoffquellen je soviel eingesetzt, dass in jedem Ansatz die gleiche definierte Menge an Stickstoff von 30 mM N vorlag. Für den Wachstumsversuch wurden die Zellen auf einen Klettwert von etwa 60 in SM-Medium mit der jeweiligen Stickstoffquelle angeimpft und das Wachstum anhand von Klettmessungen über einen Zeitraum von sechs Tagen beobachtet.

In Abbildung 3.36 ist der Verlauf der Wachstumskurven von So ce56 in SM-Medium mit un-

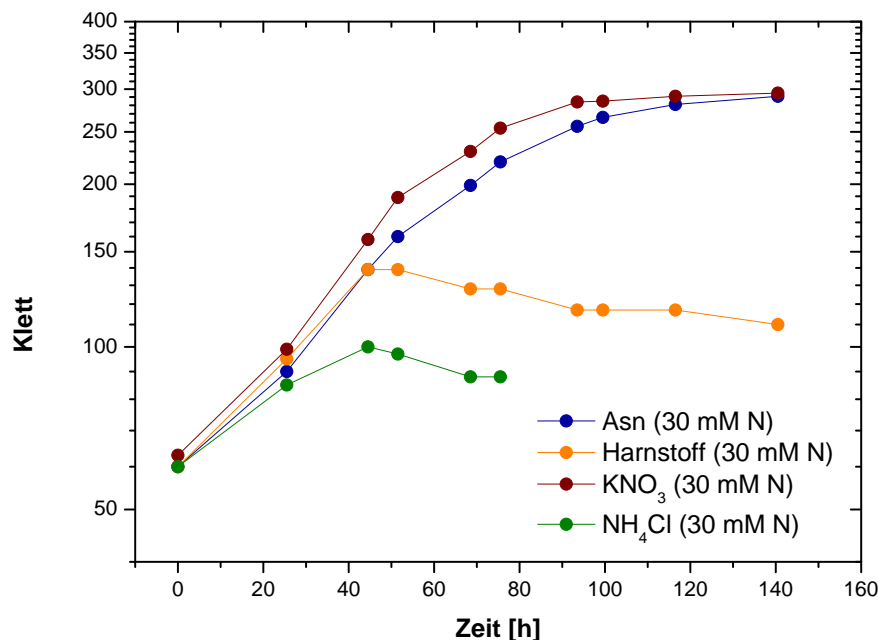


Abbildung 3.36: Vergleich des Wachstums von So ce56 in SM-Medium mit 30 mM Stickstoff in Form von Asparagin, Harnstoff, KNO₃ oder NH₄Cl.

terschiedlichen Stickstoffquellen graphisch dargestellt. Es lässt sich feststellen, dass So ce56 im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien (z. B. Cyanobakterien) nicht in der Lage ist, NH_4Cl als Stickstoffquelle zu nutzen. Dies ist einerseits deutlich an dem Abfall der Klettwerte zu erkennen, andererseits konnte bei Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop festgestellt werden, dass die Zellen schon nach 40 h fast vollständig lysiert vorlagen. Auch Harnstoff kann von den Zellen nur sehr schlecht als Stickstoffquelle verwendet werden. Im Gegensatz zu diesen beiden Stickstoffquellen zeigte sich das Wachstum von So ce56 in SM mit KNO_3 vergleichbar mit dem Wachstum in SM mit Asparagin. Für weitere Versuche zur Aufklärung der Fragestellung, inwieweit die Stickstofflimitierung einen Einfluss auf das Wachstum der *Slon2*-Mutante hat, wurde anhand der Ergebnisse KNO_3 als reine Stickstoffquelle eingesetzt. In einem nachfolgenden Experiment konnte des Weiteren gezeigt werden, dass So ce56 in SM-Medium mit 5 mM KNO_3 bis 30 mM KNO_3 als Stickstoffquelle ein vergleichbar gutes Wachstum zeigt (Daten nicht gezeigt). Auf Grund dessen wurde in den nachfolgenden Experimenten 6 mM KNO_3 als „normale“ Konzentration eingesetzt.

Hemmung des Wachstums von *Slon2* ausgelöst durch Stickstofflimitierung

Um den Effekt der Wachstumsinhibition von *Slon2* als Antwort auf Stickstofflimitierung weiter zu bestätigen, wurde das Wachstum von *Slon2* im Vergleich zu So ce56 in SM-Medium mit KNO_3 als Stickstoffquelle verfolgt. Die Zellen wurden dafür in SM-Medium mit 6 mM KNO_3 bzw. 1,2 mM KNO_3 angeimpft und das Wachstum über einen Zeitraum von fünf Tagen (bis Erreichen der stationären Wachstumsphase) unter Messung der Klettwerte verfolgt.

Der Verlauf der Wachstumskurven ist in Abbildung 3.37 graphisch dargestellt. Ebenso wie

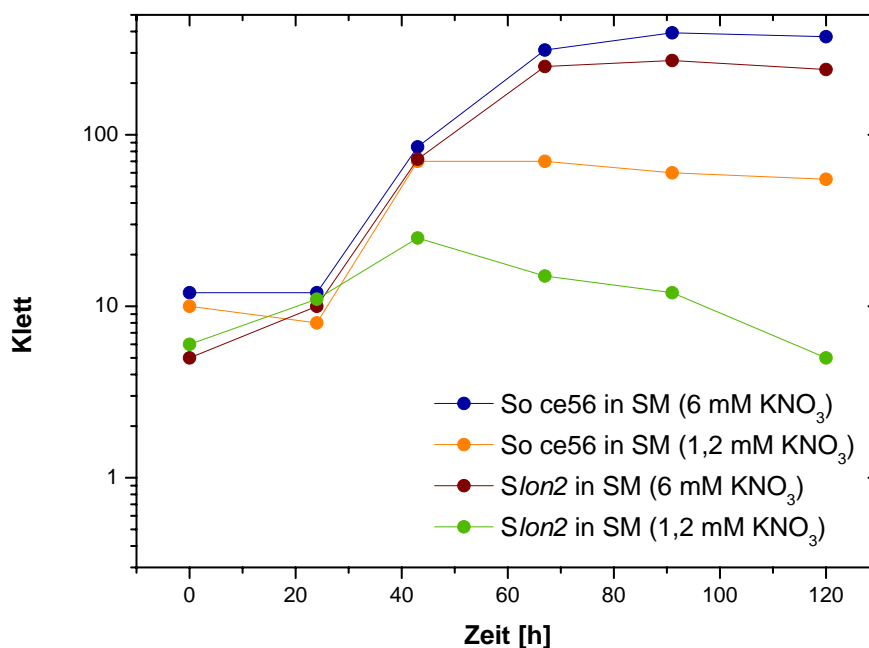


Abbildung 3.37: Vergleich des Wachstums von So ce56 und *Slon2* in SM-Medium mit unterschiedlichen Konzentration an KNO_3 anstelle von Asparagin als Stickstoffquelle.

bei Verwendung von geringen Konzentrationen an Asparagin zeigte sich auch hier ein Wachstumsdefekt von *Slon2* bei niedrigeren Konzentrationen an Stickstoff (1,2 mM KNO₃). Auch das Wachstum von So ce56 stagniert bei dieser geringen Stickstoffkonzentration, doch ist der Effekt bei Weitem nicht so ausgeprägt wie bei der Mutante.

3.5.4 In *Slon2* ist nur die phosphorylierte P_{II}-Form detektierbar

Um der Frage nach dem Substrat der Lon2-Protease in So ce56 weiter nachzugehen, wurden Proteinextrakte aus SM-Kulturen (SM mit 0,5 % Asparagin) von So ce56 und *Slon2* aus der stationären Wachstumsphase (siehe Abb. 3.38) anhand einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese mit anschließendem *Western Blot* untersucht. Die Proben wurden mit 2x Nativproben-Auftragspuffer versetzt und je 60 µg Protein pro Spur aufgetragen. P_{II} kann anhand der vorherigen Ergebnisse als potenzielles Substrat der Lon2-Proteasen angesehen werden, womit sich die Frage stellte, inwiefern die Modifikation des P_{II}-Proteins für die Erkennung durch die Lon2-Protease wichtig ist.

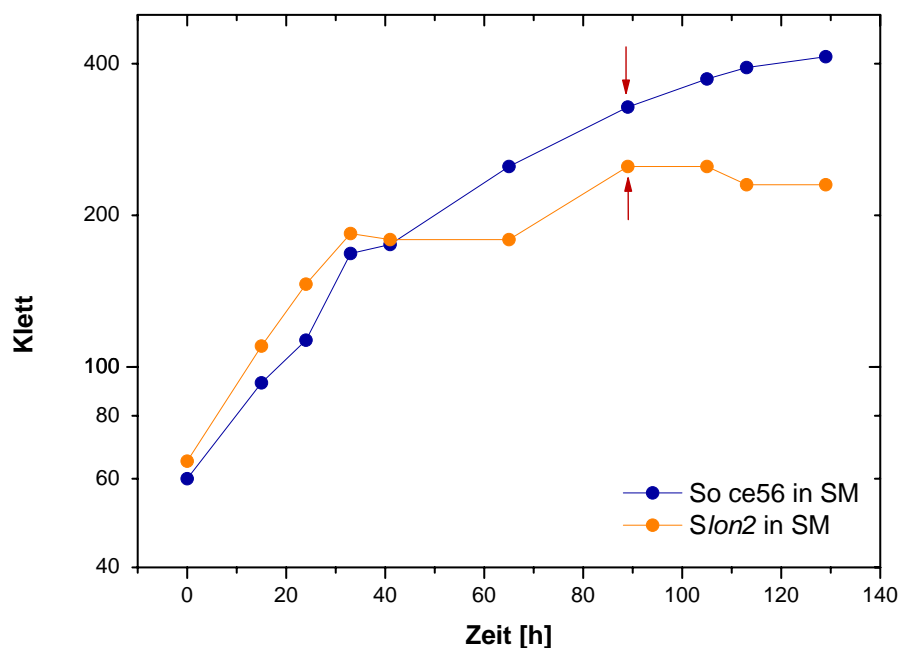


Abbildung 3.38: Wachstum von So ce56 und *Slon2* in SM-Medium. Die roten Pfeile markieren den Zeitpunkt der Probenentnahme für den nachfolgenden Vergleich der Proteinextrakte von So ce56 und *Slon2* unter nativen Bedingungen bezüglich des P_{II}-Status. Das Wachstum wurde anhand von Klettmessungen verfolgt.

In Abbildung 3.39 ist das Ergebnis des Vergleiches von P_{II} aus So ce56 und *Slon2* unter nativen Bedingungen gezeigt. Wie deutlich zu erkennen ist, konnte in dem Zellextrakt der *Slon2*-Mutante nur die phosphorylierte Form von P_{II} (P_{II}^{phos.}) beobachtet werden. Somit könnte Lon2 möglicherweise direkt oder indirekt das phosphoryliert vorliegende P_{II} degradieren, da keine unphosphorylierte Form in *Slon2* detektiert werden konnte. Ein indirekter Effekt auf eine möglicherweise vorhandene P_{II}-Phosphatase ist jedoch auch nicht auszuschließen.

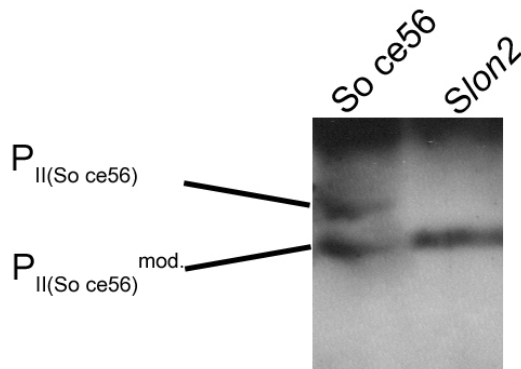


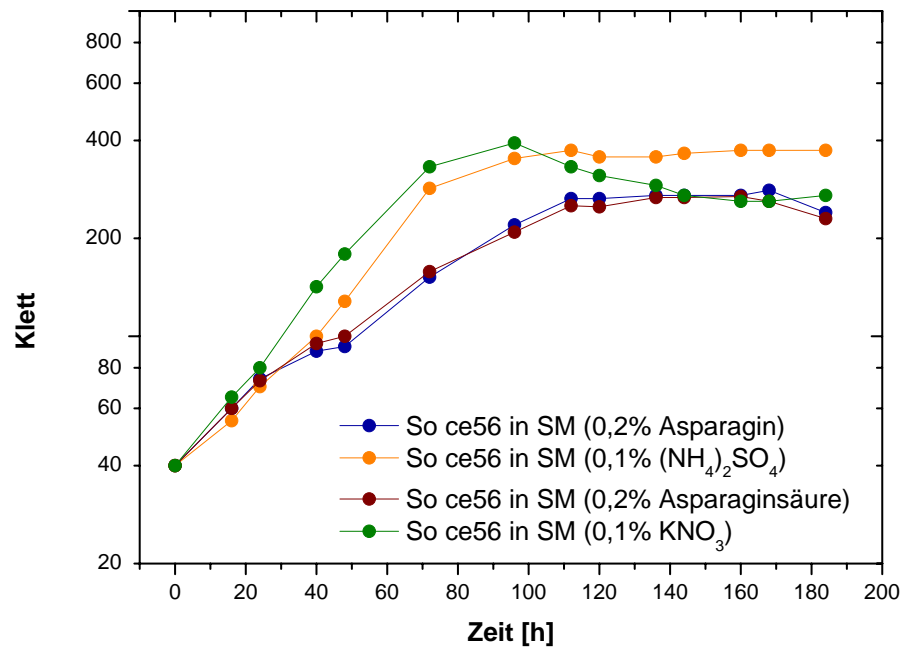
Abbildung 3.39: *Western Blot*-Analyse einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese. Separiert wurden Zellextrakte aus SM-Kulturen von So ce56 sowie *Slon2* der stationären Wachstumsphase. Als erster Antikörper (1. AK) wurde das anti-GlnB *E. coli* IgG Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Als 2. AK wurde das anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Für den *Western Blot* einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese wird anstatt der PVDF-Membran, Nitrocellulose verwendet.

3.5.5 Nutzung von unterschiedlichen Stickstoffquellen

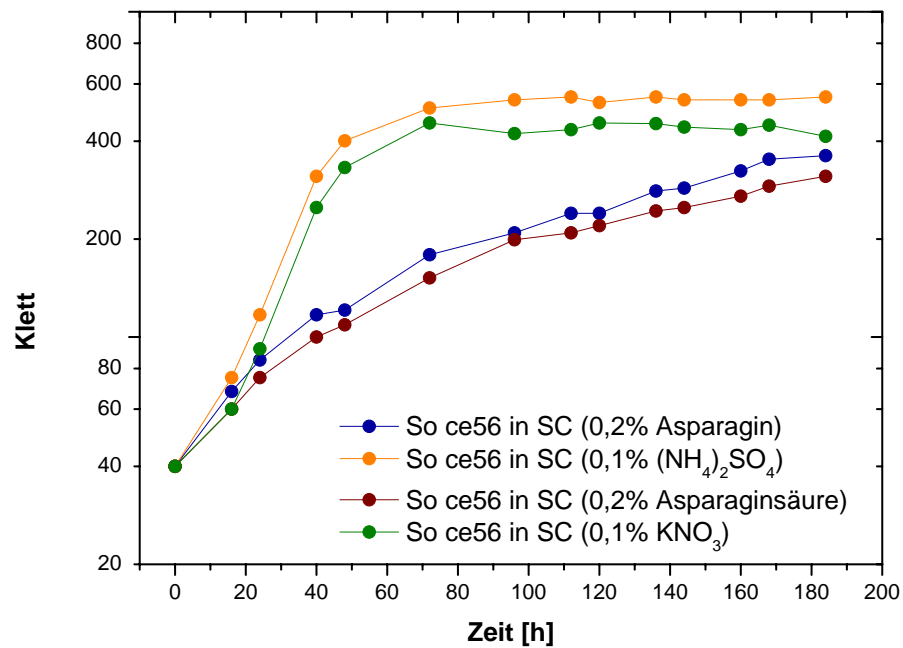
Bakterien können sich unterschiedliche Stickstoffquellen nutzbar machen. Um eine geeignete reine Stickstoffquelle für weitere Versuche zu finden, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Wachstum in SM-Medium mit Asparagin, Harnstoff, KNO_3 und NH_4Cl als Stickstoffquelle untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl Ammonium in Form von NH_4Cl als auch Harnstoff keine geeignete Stickstoffquelle für So ce56 darstellten. Nun konnte jedoch der Literatur (Müller & Gerth 2005) entnommen werden, dass Ammonium sehr wohl als Stickstoffquelle für So ce56 in Frage kommt. In der Literatur wurde jedoch Ammonium in Form von NH_4SO_4 verwendet und statt in SM-Medium (Maltose als Kohlenstoffquelle) wurde das Wachstum in SC-Medium (Cellobiose als Kohlenstoffquelle) verfolgt. Unerklärlich erschien zunächst auch die von Müller & Gerth (2005) beschriebene schlechte Ausnutzung der Stickstoffquelle KNO_3 in SC-Medium und das damit verbundene schlechte Wachstum. Dies stand wiederum im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen. Demnach konnte das Wachstum in SM-Medium mit KNO_3 als Stickstoffquelle mit dem Wachstum in SM-Medium mit Asparagin als Stickstoffquelle gleichgesetzt werden (siehe 3.36). Jedoch bestand auch hier der Unterschied in der Wahl der Kohlenstoffquelle. Auf Grund der Unstimmigkeiten zwischen den veröffentlichten Daten und den in der Arbeit gewonnen Daten bezüglich der Stickstoffquelle, wurde das Wachstumsexperiment unter den in der Literatur (Müller & Gerth 2005) beschriebenen Bedingungen wiederholt. Des Weiteren wurde ein Vergleich des Wachstums mit den beiden verschiedenen Kohlenstoffquellen angestrebt.

Für die Wachstumsversuche wurde So ce56 in SM-Medium bzw. SC-Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen angeimpft und der Verlauf des Wachstums bei 32 °C anhand der Bestimmung von Klettwerten beobachtet. Die eingesetzten Konzentration der verschiedenen Stickstoffquellen wurden der Literatur entnommen (Müller & Gerth 2005). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.40 graphisch dargestellt.

Anhand des nun gegebenen Vergleiches zwischen Wachstum in SM-Medium und SC-Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen konnte die zuvor beschriebene Unstimmigkeit geklärt werden. Ebenso wie in der Literatur von Müller & Gerth (2005) beschrieben, wurde bei Wachstum mit Ammonium in Form von NH_4SO_4 als Stickstoffquelle mit beiden Kohlenstoffquellen ein gutes Wachstum von So ce56 beobachtet (siehe Abb. 3.40). Somit lässt sich feststellen, dass in den



(a)



(b)

Abbildung 3.40: Vergleich des Wachstums in SM- bzw. SC-Medium unter Verwendung unterschiedlicher Stickstoffquellen. (a) Wachstum in SM-Medium unter Verwendung unterschiedlicher Stickstoffquellen. (b) Wachstum in SC-Medium unter Verwendung unterschiedlicher Stickstoffquellen. Die Konzentration an % eingesetzter Stickstoffquelle wurde der Literatur (Müller & Gerth 2005) entnommen. 0,2% Asparagin = 3,2 mM N; 0,2% Asparaginsäure = 1,58 mM N; 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 1,6 mM N; 0,1% KNO_3 = 1,4 mM N

vorherigen Versuchen (siehe Abb. 3.36) Ammonium in Form von NH_4Cl falsch eingesetzt wurde.

Die Unstimmigkeit bezüglich der Diskrepanz zwischen dem Wachstum mit KNO_3 als Stickstoffquelle konnte jedoch nicht geklärt werden. In beiden Fällen (Wachstum in SM- bzw. SC-Medium) konnte gutes Wachstum mit KNO_3 als Stickstoffquelle beobachtet werden (siehe Abb. 3.40). Mit diesem Versuch konnte der vorhergegangene Wachstumsversuch (Abb. 3.36) noch bestätigt werden.

3.6 Glutaminsynthetase-Test

Die metabolische Nutzbarmachung von Stickstoff variiert von Organismus zu Organismus, doch in vielen Fällen erfolgt die koordinierte Expression der Enzyme des Stickstoffmetabolismus in erster Linie als Antwort auf den intrazellulären Vorrat an Stickstoff (Merrick & Edwards 1995). Dabei fungieren Glutamat und Glutamin als wichtige Donoren für biosynthetische Reaktionen. Der wichtigste Weg für die Umwandlung von Stickstoff bzw. Ammonium ist der **G**lutamin-**S**ynthetase/**G**lutamin-**O**xoglutarat-**A**mido-**T**ransferase-Weg (GS/GOGAT). Die Umwandlung von Glutamat und Ammonium zu Glutamin wird dabei durch die Glutaminsynthetase katalysiert.

Die komplexe Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität kann dabei einerseits auf einer transkriptionellen Ebene reguliert werden, andererseits kann die Regulation jedoch auch durch Enzymmodifikation erfolgen. Auf der transkriptionellen Ebene erfolgt die Regulation über das Gen *glnA*, während die Regulation z. B. in *E. coli* durch Enzymmodifikation auf der Adenylierung bzw. der Deadenylierung der Glutaminsynthetase (GS) beruht. Die posttranslationale Modifikation in Form von Adenylierung konnte für die Familie der *Enterobacteriaceae*, *Vibrio alginolyticus*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Streptomyces cattleya* und *Streptomyces coelicolor* gezeigt werden, jedoch nicht für Spezies der Gattung *Bacillus* und *Clostridium* (Merrick & Edwards 1995).

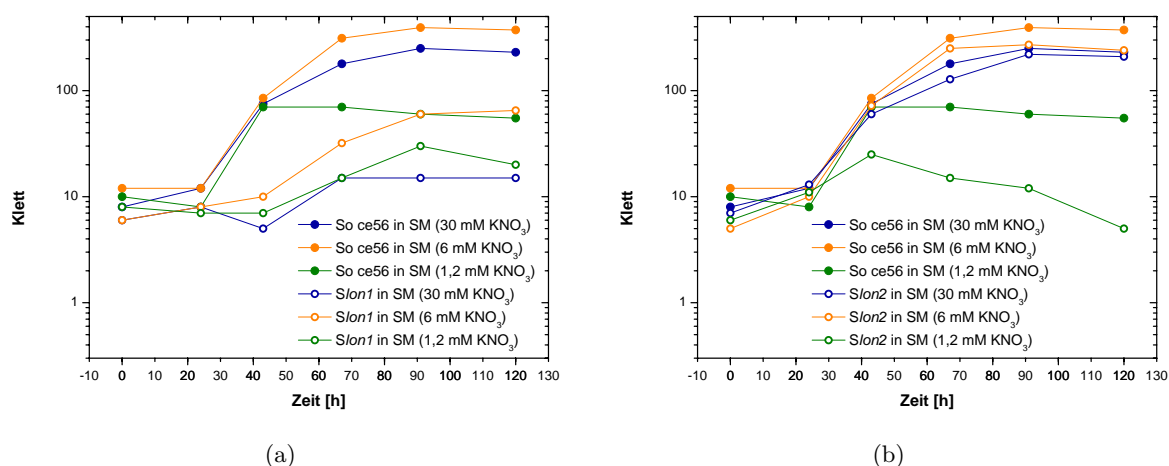


Abbildung 3.41: Vergleich des Wachstums von *So ce56*, *Slon1* und *Slon2* in SM-Medium mit unterschiedlichen Konzentration an KNO_3 als Stickstoffquelle. (a) Vergleich des Wachstums in SM-Medium von *So ce56* und *Slon1*. (b) Vergleich des Wachstums in SM-Medium von *So ce56* und *Slon2*.

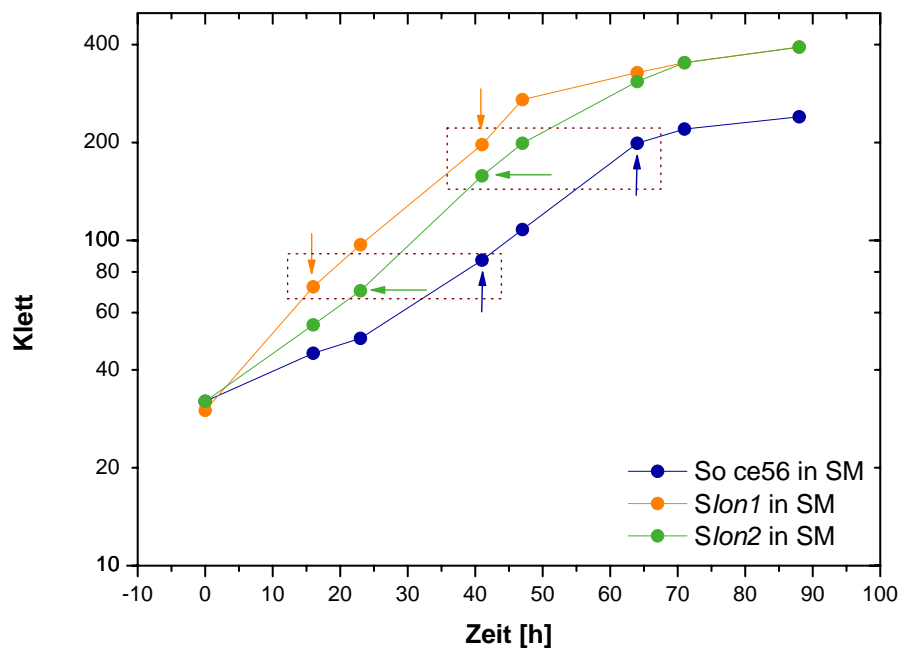


Abbildung 3.42: Wachstum von *So ce56*, *Slon1* und *Slon2* in SM-Medium. Die roten Pfeile markieren den Zeitpunkt der Probenentnahme für den Glutaminsynthetasetest. Das Wachstum wurde anhand von Klettmessungen verfolgt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Mutanten *Slon2* und *Slon1* ein Defizit im Wachstum aufwiesen, wenn sie unter stickstofflimitierenden Bedingungen angezogen wurden (siehe Abb. 3.41). Schon nach kurzer Zeit wurde das Wachstum beider Mutanten inhibiert und die Zellen begannen zu lysieren. Als einziger Unterschied sei jedoch zu nennen, dass im Gegensatz zu *Slon2* für *Slon1* schon eine geringe Limitierung an Stickstoff (6 mM KNO_3) ausreichend für die Inhibierung des Wachstums war. Doch auch mit ausreichend Stickstoff (30 mM KNO_3) zeigte diese Mutante einen Wachstumsdefekt. *Slon2* zeigte dagegen unter beiden Bedingungen keine Beeinträchtigung im Wachstum.

Nach diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese beiden Lon-Proteasen eine entscheidende Rolle im Stickstoffmetabolismus spielen. Des Weiteren wurde für *Slon2* eine Akkumulation von P_{II} unter stickstofflimitierenden Bedingungen nachgewiesen und bei der Suche nach möglichen Substraten der Lon2-Protease, konnte GlnA als weiteres potenzielles Substrat identifiziert werden (siehe 3.4.1).

Um weiter in die Untersuchung des Stickstoffmetabolismus von *So ce56* vorzudringen, wurde ein Glutaminsynthetasetest durchgeführt. Hierfür wurden *So ce56*, *Slon1* und *Slon2* in SM-Medium angeimpft. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von drei Tagen verfolgt. Zu definierten Zeitpunkten ($\cong 80$ Klett (mittlere exp. Phase); $\cong 200$ Klett (späte exp. Phase) und stationäre Phase) wurden Proben (6 x 1ml) für den nachfolgenden Test entnommen und eingefroren (siehe Abb. 3.42). Der Glutaminsynthetasetest wurde wie unter 2.10.1 beschrieben durchgeführt. Der Test wurde insgesamt dreimal wiederholt und die Werte anschließend gemittelt. Mit den restlichen Proben wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

In Abbildung 3.43 sind die Ergebnisse des Glutaminsynthetasetestes graphisch dargestellt. Die einzelnen Ergebniswerte sind der Tabelle 3.9 zu entnehmen.

Tabelle 3.9: Gemittelte Ergebnisse des Glutaminsynthetasetestes

Stamm	$\mu\text{mol } \gamma \text{ GsH} / \text{min mg Protein}$	Fehler
So ce56 (frühe exp. Phase)	126,5	$\pm 43,3$
<i>Slon1</i> (frühe exp. Phase)	234,0	$\pm 6,8$
<i>Slon2</i> (frühe exp. Phase)	205,7	$\pm 8,0$
So ce56 (späte exp. Phase)	339,7	$\pm 7,1$
<i>Slon1</i> (späte exp. Phase)	403,7	$\pm 23,4$
<i>Slon2</i> (späte exp. Phase)	414,7	$\pm 14,7$
So ce56 (stat. Phase)	129,9	$\pm 18,2$
<i>Slon1</i> (stat. Phase)	168,7	$\pm 8,2$
<i>Slon2</i> (stat. Phase)	143,9	$\pm 10,0$

Der Glutaminsynthetasetest ergab für beide Mutanten in allen Phasen des Wachstums eine leichte Erhöhung der GS-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Dies kann vermutlich auf eine verstärkte Genexpression von *glnA* zurückgeführt werden, was sich wiederum mit der Akkumulation von GlnA in *Slon2* deckt (Abb. 3.23(b))

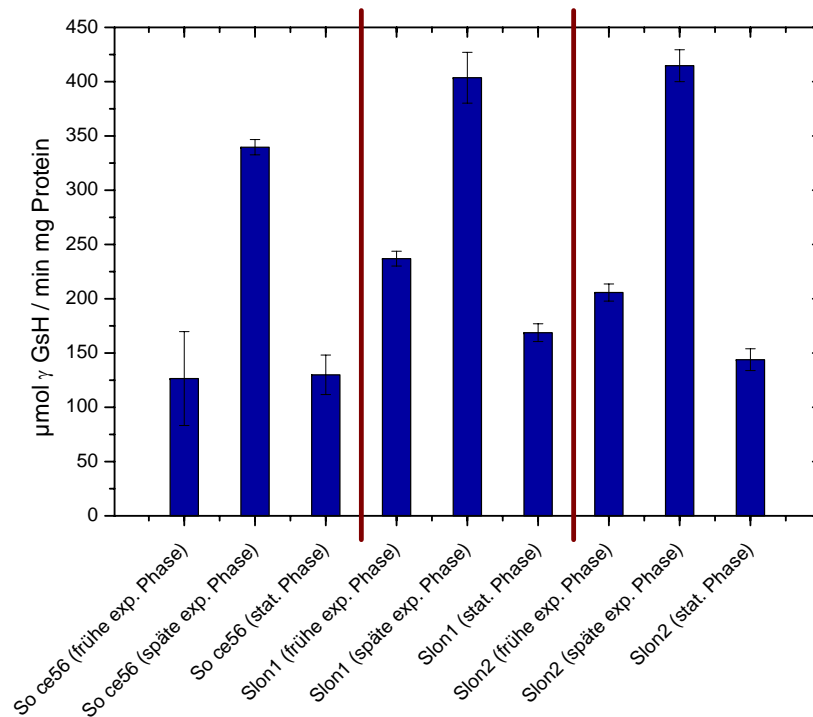


Abbildung 3.43: Graphische Darstellung der gemittelten Ergebnisse des Glutaminsynthetasetestes.

3.7 Überexpression von Lon2

Die Existenz einer Protease lässt nur bedingt Rückschlüsse auf ihre tatsächliche Aktivität in der Zelle zu. Da anhand verschiedener Experimente nachgewiesen werden konnte, dass in der Mutante *Slon2* eine Akkumulation von P_{II} zu verzeichnen ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine (indirekte oder direkte) Interaktion zwischen Lon2 und P_{II} besteht, so dass P_{II} unter reichem Nährstoffangebot direkt oder indirekt von Lon2 degradiert wird.

Um einen Nachweis zu erbringen, ob Lon2 für den Abbau spezifischer Substrate bzw. in diesem Fall für die Regulation von P_{II} in der Zelle verantwortlich ist, wurde die Protease in *E. coli* überexprimiert und anschließend aufgereinigt. Zur Überexpression wurde das Strep-tag/Strep-Tactin System der Firma IBA GmbH verwendet. Aus der Literatur war bekannt (Hövel 2002), dass mit diesem System eine Überexpression der beiden Lon-Proteasen LonA und LonB aus *B. subtilis* erfolgreich war.

Für die Überexpression der So ce56 Lon2-Protease in *E. coli* wurde zunächst das *lon2*-Gen unter Verwendung der *primer* Socelon2start und *lon2stop*-tag ohne eigenes Stoppcodon in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Zur präparativen Aufreinigung des PCR-Amplifikats wurde dieses aus einem 1 %igen Agarosegel extrahiert (siehe 2.4.7.1). Das Produkt wurde mit Hilfe des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR®-BLUNT II-TOPO® kloniert. Nach Vermehrung in *E. coli* Top10 Zellen wurden potenzielle Klone mit Hilfe von PCR und verschiedenen Restriktionen überprüft (Daten nicht gezeigt).

Über die beiden EcoRI-Schnittstellen wurde das über ein Agarosegel extrahierte Fragment in die entsprechenden dephosphorylierten Schnittstellen des Überexpressionsvektors pASK-IBA3 kloniert. Die erhaltenen Klone wurden per PCR, verschiedener Restriktionsverdaus und Sequenzierung überprüft.

Für die Überexpression wurden das Plasmid pASK-IBA3 *lon2*-tag in verschiedene *E. coli*-Zellen (BL21, spezielle Rosetta-Zellen, Top10) transformiert, wobei nur in BL21-Zellen eine geringe Überexpression zu verzeichnen war. Die Überexpression des Proteins erfolgte in zwei Kulturen á 1000 ml nach Zugabe von 0,2 mg/ml AHT (Ausgangslösung 2 mg/ml Anhydrotetracyclin in DMF) über Nacht bei 32 °C.

Die Aufreinigung der Proteine (mit C-terminalem Strep-tag) erfolgte unter nativen Bedingungen durch eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Anschließend wurden die Wasch- sowie die Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Hierbei sei erwähnt, dass zuvor beim Austesten und Optimieren verschiedener Versuchsbedingungen und anschließender Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und nachfolgender Silberfärbung keine Induktion der Expression nachgewiesen werden konnte. Lediglich per *Western Blot*-Analyse und dem Strep-Tactin *horse radish* Peroxidase-Konjugat konnte das C-terminale Lon2-Strep-tag-Fusionsprotein schon vor der Aufreinigung aus einer großen Überexpressionskultur nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 3.44 ist das Ergebnis einer erfolgreichen Aufreinigung des Lon2-Proteins mit C-terminalen Strep-tag (pASK-IBA3 *lon2*-tag) gezeigt. Durch insgesamt 10 Waschschrte konnten viele unspezifische Proteine beseitigt werden. Jedoch konnten nicht alle Kontaminationen durch

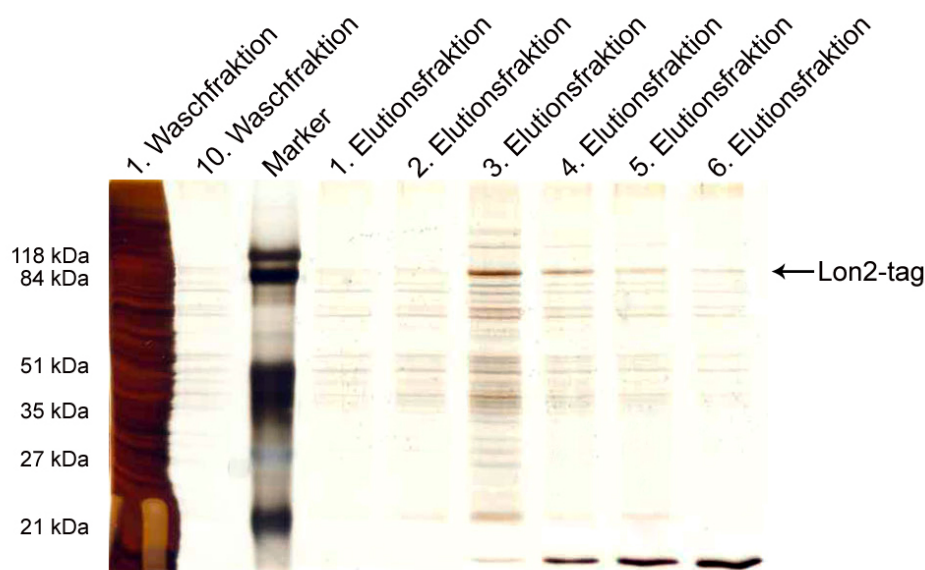


Abbildung 3.44: 12%ige SDS-PAGE mit Fraktionen der Aufreinigung von Lon2 mit dem C-terminalen Strep-tag . Von der 1. Waschfraktion wurden 2 μ l, von allen weiteren Fraktionen wurden je 20 μ l mit 5x SDS-Auftragspuffer vermischt und aufgetragen. Die Proteine wurden mit Silber angefärbt.

andere Proteine durch Reinigung eliminiert werden. In den Elutionsfraktionen 3-6 konnte ein rekombinantes Protein mit der für Lon2-tag erwarteten Größe von etwa 88 kDa gezeigt werden, wobei in der 3. Elutionsfraktion die größte Menge des rekombinanten Proteins vorhanden war. Neben der erwarteten Bande von etwa 88 kDa für Lon2-tag trat in den Elutionsfraktionen 3-6 eine stärkere Bande unter 21 kDa auf. Die Intensität der Bande nahm mit steigender Anzahl an Elutionsschritten zu. In *Western Blot*-Analysen (nach Angaben des Herstellers „*Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag*“ der IBA GmbH) mit dem Strep-Tactin *horse radish* Peroxidase-Konjugat (IBA GmbH) wurde diese Bande nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

Bis zum Ende dieser Arbeit wurden die verschiedensten Bedingungen für die Überexpression von Lon2 ausgetestet. Diese sind im Folgenden kurz aufgelistet:

- Nutzung verschiedener *E. coli*-Stämme (BL21, Top10, Rosetta-Stämme)
- Nutzung zweier unterschiedlicher Medien (LB und Minimalmedium)
- Überexpression bei unterschiedlichen Temperaturen (17 °C, RT, 32 °C und 37 °C)
- Klonierung von Lon2 in pASK-IBA15plus (N-terminaler Strep-tag)
- Klonierung von Lon2 in einen weiteren Überexpressionsvektor (pASK-IBA44), welcher die Sekretion des rekombinanten Proteins in das Periplasma erlaubt.

Es war jedoch nicht möglich, bis zum Ende dieser Arbeit ausreichende Mengen an Lon2 zu gewinnen. Dementsprechend konnten weiterführende Experimente bezüglich spezifischer Enzymaktivität der Lon2-Protease nicht gestartet werden.

4 Diskussion

Myxobakterien zeichnen sich neben der Eigenschaft unter Nährstofflimitierung eine multizelluläre Morphogenese zu durchlaufen, durch die Produktion zahlreicher Sekundärmetabolite aus. Diese Eigenschaft rückte sie in den siebziger Jahren in den Blickpunkt der Forschung. Aus der Gruppe dieser Myxobakterien wurde 2001 als Modellorganismus *S. cellulorum* So ce56 für ein Genomprojekt ausgewählt, da dieses sowohl zur morphologischen als auch zur physiologischen Differenzierung befähigt ist. Die Erforschung von So ce56 sollte einen weiteren Einblick in die Biologie der Myxobakterien geben und insbesondere helfen, die physiologische Differenzierung und deren Potenzial besser zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elementare Arbeiten zur morphologischen und physiologischen Differenzierung in So ce56 unternommen. Diese beinhalteten zum Einen die Etablierung eines geeigneten Differenzierungsassays für So ce56 und zum Anderen die genauere Charakterisierung der potenziell an der Differenzierung beteiligten Genprodukte ApgA sowie der Lon-Proteasen Lon1 bis Lon5. Von diesen ist bekannt, dass sie in der morphologischen Differenzierung des Myxobakteriums *M. xanthus* eine wichtige Rolle einnehmen. Von *apgA* aus *M. xanthus* ist bekannt, dass es neben vier weiteren *apg*-Genen mit für die Bildung des A-Signals verantwortlich ist, welches die Differenzierung bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte initiiert. Neben ApgA ist auch die Lon-Protease BpgA ($\hat{=}$ LonD) früh in die Differenzierung von *M. xanthus* involviert, weswegen die fünf in So ce56 gefundenen Lon-Proteasen ebenso wie ApgA hinsichtlich ihrer Rolle in der Differenzierung von So ce56 untersucht wurden. Im Verlauf der Arbeit gelangten die in So ce56 identifizierten Lon-Proteasen mehr und mehr in den Blickpunkt der Untersuchungen hinsichtlich deren Rolle im Stickstoffmetabolismus von So ce56.

Bisherige Untersuchungen der morphologischen Differenzierung und des Stoffwechsel wurden vor allem an dem Myxobakterium *M. xanthus* unternommen. Im Laufe dieser Arbeit konnten einige Parallelen zu dessen morphologischer Differenzierung, aber auch einige Unterschiede hinsichtlich des Stoffwechsel aufgedeckt werden.

4.1 Morphologische Differenzierung

Zur Untersuchung der morphologischen Differenzierung von So ce56 konnte ein Differenzierungsassay etabliert werden, der eine schnelle und reproduzierbare Differenzierung von So ce56 zu multizellulären Fruchtkörpern ermöglicht. Dabei konnten Parallelen zu der Differenzierung von *M. xanthus*, des Eukaryoten *Dictyostelium discoideum* und *B. subtilis* gezogen werden. Von allen Dreien ist bekannt, dass die Differenzierung als Antwort auf zwei verschiedene Ereignisse eingeleitet wird - Reduzierung der Nährstoffe und interzelluläre Signale (Fisher 2005). Beide Ereignisse scheinen auch in So ce56 die Bildung von Fruchtkörpern auszulösen. So wurde beobachtet,

dass die Initiierung der Differenzierung in So ce56 erst nach einer drastischen Reduzierung der Nährstoffe auf 1 % der im Komplexmedium vorhandenen Nährstoffe erfolgte (siehe 3.1 auf Seite 65). Mit der zunächst schrittweisen Reduzierung der Nährstoffe sollten die für die Initiation der Differenzierung von So ce56 benötigten Nährstoffbedingungen eingegrenzt und eine schnelle Differenzierung unter Laborbedingungen ermöglicht werden. Das Differenzierungsmedium beinhaltete nur noch 0,001 % Probion, 0,002 % Pepton und 0,005 % Stärke. Diese Konzentrationen stellten einen oberen Grenzwert dar, da bereits bei geringer Erhöhung der Konzentration das Differenzierungsmedium seine Funktion nicht mehr erfüllte.

Das Erreichen einer bestimmten Zelldichte scheint ebenso wie in *M. xanthus* auch für So ce56 ein entscheidendes Kriterium für die Initiation der Differenzierung darzustellen. Erst ab einer Zelldichte mit Zellzahlen von etwa $1,6 \cdot 10^{10}$ wurde eine Bildung von Aggregaten und Fruchtkörpern beobachtet (siehe Kapitel 3.1.2 auf Seite 67). Geringere Zellzahlen brachten nicht den gewünschten Erfolg. Das A-Signal aus *M. xanthus* ist Teil eines Systems, das die Zelldichte in hungernden Zellen misst. Das A-Signalsystem garantiert somit, dass die Fruchtkörperbildung nicht initiiert wird, bevor nicht eine genügend große Zahl an Zellen hungert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass So ce56 ähnlich wie *M. xanthus* in Form eines *quorum-sensing*-Mechanismus die Zelldichte von hungernden Zellen wahrnehmen kann.

Neben diesen Parallelen fiel jedoch auch Gegensätzliches zu der Differenzierung von *M. xanthus* auf. Um die Differenzierung von *M. xanthus* zu beschleunigen, werden diesem schon zuvor durch Waschen in Differenzierungsmedium drastisch die Nährstoffe entzogen. Diese Vorgehensweise war mit So ce56 nicht möglich (siehe Kapitel 3.1.2 auf Seite 67). Nur unter Benutzung eines Komplexmedium zum Waschen und Aufkonzentrieren wurde eine Differenzierung von So ce56 erreicht. In diesem Stadium benötigte So ce56 im Gegensatz zu *M. xanthus* noch alle Nährstoffe, um zu einem späteren Zeitpunkt auf Differenzierungsmedium (P-Diff-Agar) die Differenzierung zu initiieren. Campos & Zusman (1975) konnten jedoch auch für *M. xanthus* zeigen, dass Nährstoffe die Differenzierung positiv beeinflussen können. Unter Bedingungen mit adäquaten Mengen an Nährstoffen konnten sie besser differenzierte Fruchtkörper beobachten als unter nährstoffärmeren Bedingungen. Des Weiteren konnten sie unter nährstoffärmeren Bedingungen die Induktion von Myxosporen beobachten, ohne dass es zur Ausbildung von Fruchtkörpern kam. Daraus schlossen Campos & Zusman (1975), dass unter stark nährstoffarmen Bedingungen die zelluläre Morphogenese zu Myxosporen gegenüber der multizellulären Differenzierung zu Fruchtkörpern dominant ist. Da die Morphogenese zu Myxosporen in *S. cellulorum* rudimentär ist und diese sich nicht von vegetativen Zellen unterscheiden, kann keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen Nährstoffangebot und Myxosporenbildung, wie es von *M. xanthus* bekannt ist, getroffen werden.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass So ce56 auf einem speziellem Differenzierungsmedium (P-Diff) zu einer schnellen und reproduzierbaren morphologischen Differenzierung befähigt ist. Für die Differenzierung benötigt So ce56 ebenso wie *M. xanthus*, *B. subtilis* und *D. discoideum* die zwei Ereignisse Nährstofflimitierung und das Erreichen einer spezifischen Zelldichte, um eine multizelluläre Morphogenese zu Fruchtkörpern zu durchlaufen.

4.2 Einfluss von *asgA* auf die Differenzierung in *S. cellulorum* So ce56

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des Signaltransduktionsproteins AsgA aus So ce56 während der morphologischen Differenzierung untersucht. Bereits veröffentlichte Arbeiten an dem Myxobakterium *M. xanthus* zeigten, dass AsgA maßgeblich an der Differenzierung beteiligt ist und sich aus einer N-terminalen *receiver*-Domäne sowie einer C-terminalen Histidinkinase-Domäne aufbaut. Durch Sequenzvergleiche wurde ein zu *asgA* aus *M. xanthus* homologes Gen in So ce56 identifiziert. Über die Funktion dieses Genprodukts von *asgA* in So ce56 lagen bisher keinerlei Informationen vor, weswegen die Charakterisierung der Funktion dieses Proteins in So ce56 angestrebt wurde. Dazu wurde eine *asgA*-Mutante von So ce56 untersucht, deren chromosomales *asgA*-Gen durch homologe Rekombination unterbrochen wurde. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei zunächst die phänotypische Charakterisierung der Mutante *SasgA*.

4.2.1 Konstruktion von *SasgA*

Um den Einfluss einer Mutation im *asgA*-Gen von So ce56 auf die morphologische und physiologische Differenzierung zu untersuchen, wurde zunächst erfolgreich eine *asgA*-Mutante konstruiert. Die Mutante erhielt den Namen *SasgA*.

Die Integration des Plasmids pSUPHyg *asgA* in das Chromosom von So ce56 führte als Folge eines *single crossovers* zu einer Insertion, so dass für ein vollständig kodierte Protein 42 Aminosäuren vom C-terminalen Ende der Histidinkinase-Domäne fehlten. In AsgA/AsgD von *M. xanthus* ist diese Region vermutlich essentiell, da eine Mutation in diesem Bereich zu einem ausgeprägten Phänotyp führte und eine A-Signal-Produktion unterblieb. Die verschiedenen *asgA*-Mutanten von *M. xanthus* gehen vor allem auf Punktmutationen im C-terminalen Bereich (Histidinkinase-Domäne) des Proteins zurück (Kuspa & Kaiser 1989). Nur zwei der *asgA*-Mutanten von *M. xanthus* wurden genauer untersucht. Lange Zeit galt *asgA476* als repräsentativste *asgA*-Mutante in *M. xanthus*. In dieser Mutante liegt eine Punktmutation in Form einer Transition vor, die aus einem Austausch von Leucin zu Prolin resultiert. Die Punktmutation dieser Mutante ist im N-terminalen Bereich (455 nt; *response*-Regulator) lokalisiert. Im Gegensatz dazu ist die Mutation der *asgA473*-Mutante im C-terminalen Bereich lokalisiert und wird durch einen Austausch von Serin (S) zu Phenylalanin (F) bewirkt. Bei beiden Mutanten konnte AsgA in *Western Blot*-Analysen noch detektiert werden, doch war das Protein der *asgA473*-Mutante stabiler (Dunmire et al. 1999).

Ebenso wie in *M. xanthus* ist das AsgA-Protein von So ce56 aus einer N-terminalen *receiver*-Domäne und einer C-terminalen Histidinkinase-Domäne aufgebaut. BLAST-Analysen der beiden Proteine ergaben Homologien untereinander und für beide Domänen charakteristische Aminosäuren sind in beiden Proteinen vorhanden (siehe Abb. 4.1). Die *receiver*-Domäne des AsgA-Proteins aus So ce56 weist mit 38,2 % Identität eine höhere Homologie zu der entsprechenden Domäne des AsgA-Proteins aus *M. xanthus* auf, als die Histidinkinase-Domäne (32,5 % Identität). Ausgehend von der *asgA473*-Mutante von *M. xanthus* ist sowohl in dieser Mutante als

AsgA (So ce56):	7	ERRALLIVDDERETLKALRRELRRDYDVLIASAEQGHAILRERT--IPVVLSDQRMPT	64
AsgA (M. xanthus):	5	ELPAVLVYDDDALNLRVFDANFGQFRIFRSSSPSEALALLEQRGEIGVILSDQRMPTGM	64
AsgA (So ce56):	65	TGTEFCARLRAEFPEFVRLMTAYADTSAAIQAINEGGVYRFISKPWDPPALAGVVSDAF	124
AsgA (M. xanthus):	65	TGVELLERARTIAPDAKRLVTAYADMQAVIDAVNRGQVTRVFKPWDRTQLQAALDDAL	124
AsgA (So ce56):	125	AQHERISSCQRLSSLKTSAEALHLENQQLAEVTQRT----HELMGVAAHDLRNPITAAIQ	180
AsgA (M. xanthus):	125	-----KIAKLELRIR-EVEGRMLKSERLATLGQVTAGIAHELMGPVGY-LSQNVASLQ	175
AsgA (So ce56):	181	--WFSTMQLAGAGVGPEDTRRYALKIQDNAEFALQLLEDLLD-ITTLEHGNGGLRLQ---	234
AsgA (M. xanthus):	176	RDLGSVIQYVSRHLQTDPEPAVAETVED----LPALIKDLADGAELRQVALGLRAQARG	231
AsgA (So ce56):	235	-----EADLRGILSAAVSLNEHGAGRKGIAVHVDVPADLPLVCCDVARIEQVLSNLLSNA	289
AsgA (M. xanthus):	232	EDLEATADVAEVVSFAVKLARAVERERARLTSNGEPV---RVTFGPVKLCQVLLNLIVNA	288
AsgA (So ce56):	290	FKFSHPGTT-----VTVRARRLGQAIEVMIEDQGLGIRPDEISGLFRKFRRITSTRSTGGE	344
AsgA (M. xanthus):	289	AQAM--GTTGRPGRIEVRWTTTPDDVVLTVADNCGIIPMEQQERVFPQPMFTTKPVGVG--	344
AsgA (So ce56):	345	KSTGLGLSICKNLVERHGGAIRVESELGRGTRVFFTL	381
AsgA (M. xanthus):	345	--TGLGLSICRELVTQFGGSLRLSSIQEGTEIEITL	379

Abbildung 4.1: BLAST-Analyse (*SDSC Biology workbench 3.2*) von AsgA aus So ce56 gegen AsgA aus *M. xanthus* (Altschul et al. 1997). Charakteristische bzw. hochkonservierte Aminosäuren der *receiver*-Domäne und der Histidinkinase-Domäne sind rot hervorgehoben. Konservierte Aminosäuren sind in rot gekennzeichnet, ähnliche Aminosäuren sind grün markiert. Das mit einem blauen Kasten markierte Serin in der AsgA-Proteinsequenz von *M. xanthus* kennzeichnet den Ort der Mutation in der *asgA473*-Mutante (S → F). Der gestrichelte Kasten in der AsgA-Proteinsequenz von So ce56 kennzeichnet den Bereich, der in der Mutante *SasgA* nicht mehr vorhanden ist. Der hellblaue Strich unter der *M. xanthus*-Proteinsequenz kennzeichnet den Bereich der *receiver*-Domäne, der gelbe Strich markiert den Bereich der Histidinkinase-Domäne.

auch in der *asgA*-Mutante von So ce56 jede dieser konservierten Aminosäuren noch vorhanden. Trotzdem ist die Produktion des A-Signals wie auch die morphologische Differenzierung (siehe Abb. 4.2(a)) der *asgA473*-Mutante von *M. xanthus* inhibiert (Dunmire et al. 1999). Daraus lässt sich schließen, dass auch dieser C-terminale Bereich der Histidinkinase-Domäne funktionell wichtig für die Bildung des A-Signals ist. Da in der *asgA*-Mutante von So ce56 dieser C-terminale Bereich nicht mehr exprimiert wird, kann man davon ausgehen, dass das verkürzte AsgA-Protein in der Mutante nicht mehr voll funktionsfähig ist. Dies konnte im weiteren Verlauf anhand des Phänotyps der Mutante bestätigt werden (siehe 3.2.3.2 auf Seite 76).

Da *input*- und *output*-Domäne, wie sie aus klassischen Zwei-Komponentensystemen bekannt sind, im AsgA-Protein von *M. xanthus* fehlen, vermutete man, dass AsgA Teil eines *phosphorelay*-Systems ist (Plamann et al. 1995). Ein ähnliches System ist von der Initiation der Sporulation in *B. subtilis* bekannt (Burbulys et al. 1991, Hoch 2000). Dieses erlaubt die Integration von verschiedenen differenzierungsrelevanten Signalen, um die Aktivierung des am Ende des *phosphorelay*-Systems stehenden Transkriptionsregulators Spo0A zu steuern (Burbulys et al. 1991). Alternativ wurde für AsgA aus *M. xanthus* die Vermutung aufgestellt, dass die *receiver*-Domäne als *input*-Domäne der Sensorhistinkinase fungiert. Als mögliche Liganden könnten dann kleine Phosphordonoren wie Acetyl-Phosphat oder Carbamoyl-Phosphat fungieren (Lukat et al. 1992), von denen *in vitro* schon gezeigt wurde, dass sie *response*-Regulatoren (*receiver*-Domäne) phosphorylieren. Diese Intermediate könnten dann auch zur Wahrnehmung des zellulären Status durch das A-Signal dienen (Plamann et al. 1995). Anhand der Homologie (25,8 % Identität) zwischen AsgA aus *M. xanthus* und So ce56 können beide Vermutungen ein *phosphorelay*-System betreffend auf So ce56 übertragen werden. Auch in dem AsgA-Protein von So ce56 fehlen die *input*- und *output*-Domäne.

Für AsgA aus *M. xanthus* wurde des Weiteren vermutet, dass die weiteren identifizierten Asg-Proteine, vor allem aber das DNA-Bindeprotein AsgB, in dieses *phosphorelay*-System involviert sind. Neben AsgA konnten in So ce56 auch einige AsgB- und AsgC-homologe Proteine gefunden werden, doch treten diese in einer so großen Abundanz auf, dass eine genauere Identifizierung bzw. Zuordnung bisher nicht durchgeführt wurde. Zum Verständnis dieses möglichen *phosphorelay*-Systems könnte nun die Identifizierung und Zuordnung möglicher Interaktionspartner beitragen.

4.2.2 Phänotypische Charakterisierung von *SasgA*

Für die phänotypische Charakterisierung von *SasgA* wurde zum Einen der Einfluss der *asgA*-Mutation von So ce56 auf die morphologische Differenzierung und zum Anderen die Auswirkung der Mutation auf den Sekundärmetabolismus von So ce56 untersucht. Für die Charakterisierung der Mutante sind beide Arten der Differenzierung von Interesse, da in manchen Organismen eine Kopplung zwischen der morphologischen und der physiologischen Differenzierung besteht (Demain 1998).

Die Mutante *SasgA* zeigte unter Nährstoffmangelbedingungen im Vergleich zum Wildtyp weder die Bildung von Fruchtkörpern, noch war sie in der Lage, Aggregate auszubilden (siehe 3.2.3.2 auf Seite 76). Die Mutante ist demnach schon sehr früh in der Differenzierung gehemmt. Ähnliches konnte für die *asgA*-Mutante DK473 von *M. xanthus* gezeigt werden (siehe Abb. 4.2). Auch diese ist unter Nährstoffmangelbedingungen nicht in der Lage zu aggregieren und Fruchtkörper zu bilden. Das verkürzte AsgA-Protein von *SasgA* ist demnach nicht mehr voll funktionsfähig, da ansonsten ein Wildtyp-ähnlicher Phänotyp aufgetreten wäre.

Über die Produktion von Sekundärmetaboliten ist von allen *asg*-Mutanten (*asgA*, *asgB*, *asgC*, *asgD* und *asgE*) von *M. xanthus* bisher nichts bekannt, da das Hauptaugenmerk der Untersuchungen an *M. xanthus* vor allem auf der morphologischen Differenzierung lag. Diesbezüglich

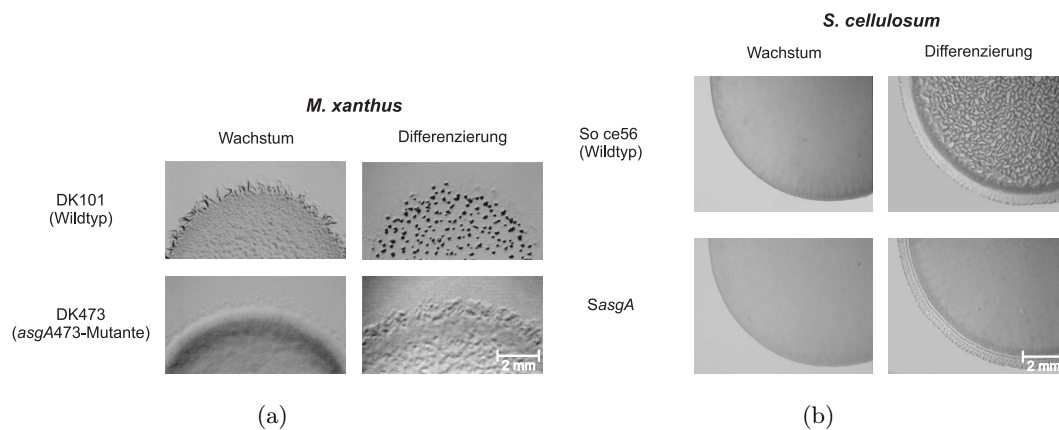


Abbildung 4.2: Vegetative und Differenzierungsphänotypen von *M. xanthus* DK101 (Wt), DK473 (Abb. 4.2(a)), *S. celluloseum* So ce56 (Wt) und *SasgA* (Abb. 4.2(b)) im Vergleich. Die Bilder von *M. xanthus* sind der Literatur (Dunmire et al. 1999) entnommen.

konnten keine Parallelen zwischen beiden *asgA*-Mutanten gezogen werden. *SasgA* zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in der Produktion der von So ce56 produzierten Sekundärmetabolite Etnangien und Chivosazol (siehe 3.2.3.3 auf Seite 76). Es ist jedoch bekannt, dass in manchen Organismen die Sekundärmetabolitproduktion mit der morphologischen Differenzierung gekoppelt vorliegt (Demain 1998). So wird z. B. in Streptomyceten durch Nährstoffmangelbedingungen die Produktion von Sekundärmetaboliten ausgelöst (Pope et al. 1998). Es konnte jedoch für *M. xanthus* gezeigt werden, dass der Eintritt in die Differenzierung nicht notwendig für die Produktion von Sekundärmetaboliten ist, da auch nicht-differenzierungsfähige Mutanten von *M. xanthus* zur Sekundärmetabolitproduktion (Antibiotikum TA aus *M. xanthus*) in der Lage sind (Reichenbach 1993). Gleiches konnte für die *asgA*-Mutante von So ce56 bestätigt werden. Da der Bioassay zur Detektion der produzierten Sekundärmetabolite nicht unter Differenzierungsbedingungen durchgeführt wurde, kann auch für den Wildtyp So ce56 bestätigt werden, dass nicht zwingend eine Abhängigkeit zwischen morphologischer und physiologischer Differenzierung existiert. Außerdem konnte Knauber (2006) für So ce56 zeigen, dass schon in der exponentiellen Phase geringe Mengen der beiden Sekundärmetabolite gebildet wurden und es in der stationären Phase zu einem Anstieg der Produktion kam. Des Weiteren lässt sich nach diesen Ergebnissen feststellen, dass *AsgA* kein positiver Regulator der Sekundärmetabolitproduktion in So ce56 ist, da kein Unterschied in der physiologischen Differenzierung zwischen der *asgA*-Mutante und So ce56 auftrat.

Auf Grund der Homologie der Proteine und der Ähnlichkeit im Phänotyp zwischen der *asgA*-Mutante aus So ce56 und *M. xanthus* wurde vermutet, dass ein A-Signal-ähnlicher Stoff von So ce56 ins Medium sezerniert wird. Daraufhin wurden Versuche auf Basis des sogenannten A-Faktor-Assays (Plamann et al. 1992) durchgeführt. Dieser sollte einen indirekten Nachweis von diffusionsfähigen A-Signal-ähnlichen Stoffen liefern. Der A-Faktor-Assay in *M. xanthus* beruht auf der Synthese von β -Galaktosidase durch eine *asg*-Mutante, die die früheste *asg*-abhängige *lacZ*-Fusion, $\Omega 4521$, trägt (Kuspa et al. 1992). Mischt man z. B. einen Wildtyp mit solch ei-

ner *asg*-Mutante (DK9009), kann ein Anstieg der β -Galaktosidase mittels des β -Galaktosidase-Assays detektiert werden, da der Wildtyp durch extrazelluläre Signale die Mutation der *asg*-Mutante komplementiert. Da in So ce56 solch eine *asg*-Mutante nicht vorlag, wurde auf Grund der nahen Verwandtschaft zwischen *M. xanthus* und So ce56 ein „gemischter“-A-Faktor-Assay angesetzt. Dieser A-Faktor-Assay konnte jedoch nicht etabliert werden. Probleme ergaben sich aus der Wahl des Mediums für den A-Faktor-Assay. Davon abgesehen konnten bei Positivkontrollen mit Wildtypen von *M. xanthus* keine reproduzierbaren Ergebnisse erlangt werden, so dass der A-Faktor-Assay in der durchgeführten Variante fragwürdig war.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf Grund einer Instabilität der ersten Mutante, zwei *SasgA*-Mutanten nach dem gleichen Schema konstruiert. Erste Differenzierungsassays mit der ersten Mutante zeigten, dass zu Anfang die Differenzierung dieser Mutante noch inhibiert war, jedoch nach langanhaltender Kultivierung kein Defekt in der Differenzierung mehr vorlag. PCR-Analysen ergaben, dass im Chromosom dieser „*asgA*-“Mutante kein integriertes Plasmid mehr nachgewiesen werden konnte. Daher wurde zunächst vermutet, dass diese Mutation über einen längeren Zeitraum gesehen letal für den Organismus war. Nach Konstruktion und Testen einer zweiten Mutante zeigte sich jedoch, dass diese über einen längeren Zeitraum stabil blieb. Die Mutation scheint demnach nicht letal zu sein. Gleichwohl wurden alle Experimente nur mit frisch aus der Stammsammlung angezogenen Zellen durchgeführt.

4.2.2.1 Regulation des *asgA*- Gens in So ce56

Aus *M. xanthus* ist bekannt, dass die Expression des *asgA*-Gens unter Differenzierungsbedingungen ansteigt (Plamann et al. 1995). Um die Regulation des *asgA*-Gens aus So ce56 unter Differenzierungsbedingungen zu testen, wurden Real-time RT-PCR-Experimente mit *asgA*-spezifischen *primern* auf RNA von So ce56 durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse ergaben eine positive Regulation der *asgA*-Expression unter Nährstoffmangelbedingungen (siehe 3.2.4 auf Seite 78). Damit ergibt sich eine Analogie zwischen der Expression von *asgA* aus So ce56 und *M. xanthus*. In beiden Fällen wird die *asgA*-Expression unter Nährstoffmangelbedingungen positiv reguliert. Für *asgD* aus *M. xanthus*, dessen Genprodukt ebenfalls eine große Homologie zu *AsgA* aus So ce56 aufweist, konnte von Cho & Zusman (1999) ermittelt werden, dass unter vegetativen Bedingungen keine Expression von *asgD* stattfindet, wohingegen es wiederum unter Nährstoffmangelbedingungen zu einem Anstieg der Genexpression kam. Somit weist auch die Expression des *asgA*-Gens eine große Ähnlichkeit zu den bekannten Daten der Expression der *asgA/asgD*-Gene von *M. xanthus* auf.

Von *M. xanthus* war bekannt, dass (p)ppGpp als Initiationssignal der Differenzierung fungiert. Nährstoffmangel in Form von Aminosäuremangel aktiviert dabei das Protein RelA, was zu einer Akkumulation von ppGpp führt (Singer & Kaiser 1995). Die Akkumulation von ppGpp stimuliert die Expression der frühen Differenzierungsgene, wie z. B. die der *asg*-Gene, und führt so zur Produktion des A-Signals (Singer & Kaiser 1995). Dementsprechend ist in *M. xanthus* die Expression des *asgA*-Genes abhängig von der stringenten Kontrolle. Anhand Real-time RT-PCR konnte dies auch für die Expression des *asgA*-Genes aus So ce56 nachgewiesen werden, da in

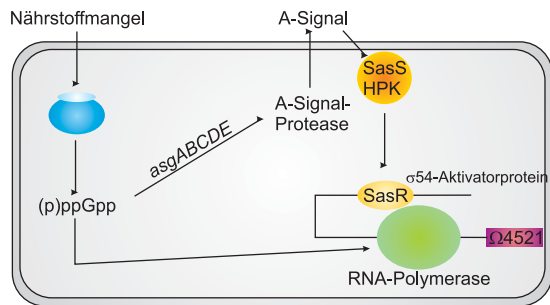


Abbildung 4.3: Modell der Kontrolle der Differenzierung in *M. xanthus* ausgehend von (p)ppGpp (Kaiser 2004). Nährstoffmangel führt zur Akkumulation von ppGpp, was wiederum die Expression der *asg*-Gene stimuliert. Die Produktion des A-Signals wird durch die Histidinkinase SasS registriert und das Signal an den *response*-Regulator SasR weitergeleitet.

der *stringent response*-Mutante von So ce56 (*Srel*) eine negative Regulation der *asgA*-Expression festgestellt wurde (siehe 3.2.5 auf Seite 79). Dies wird auch durch den morphologischen Phänotyp der *stringent response*-Mutante *Srel* unterstützt (Knauber 2006). Unter Differenzierungsbedingungen ist diese Mutante nicht in der Lage, Fruchtkörper zu bilden.

In Anlehnung an die Kontrolle der Differenzierung in *M. xanthus* (Abb. 4.3) und auf Grund der Ergebnisse der Real-time RT-PCR kann man festhalten, dass die Akkumulation von (p)ppGpp zur Aktivierung der Expression des *asgA*-Genes führt. In *M. xanthus* wird das extrazelluläre A-Signal von der Histidinkinase SasS registriert. SasS ist ein Transmembranprotein und fungiert als Sensorkinase in dem Zweikomponentensystem SasS/SasR aus *M. xanthus*. SasS wiederum aktiviert den *response*-Regulator SasR, der als Regulationsprotein in die Genexpression früher Differenzierungsgene eingreift (Yang & Kaplan 1997). BLAST-Analysen mit SasS und SasR von *M. xanthus* gegen So ce56 ergaben eine Vielzahl SasS und SasR-homologer Proteine für So ce56. Auf Grund dessen wurde dieser Regulationsweg bisher nicht weiter verfolgt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Regulation der Differenzierung von So ce56 in ähnlicher Weise verläuft.

4.3 Einfluss der Lon-Proteasen auf die Regulation des Metabolismus von *S. cellulorum* So ce56

Lon-Proteasen sind ATP-abhängige Proteasen und an der Regulation verschiedener biologischer Prozesse in Bakterien beteiligt (Tsilibaris et al. 2006). In *M. xanthus* konnte eine Beteiligung der Lon-Protease BsgA ($\hat{=}$ LonD) an der Differenzierung beobachtet werden. Eine Mutation des *bsgA*-Gens in *M. xanthus* äußerte sich in einem Defekt in der frühen Differenzierung der Mutanten (Tojo et al. 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daraufhin die Rolle der Lon-Proteasen in So ce56 untersucht. Einige Experimente konnten nicht mit allen fünf Mutanten durchgeführt werden, da sich die Konstruktion aller Mutanten, über die Länge dieser Arbeit hinzog.

Anhand von Sequenzvergleichen von *bsgA* ($\hat{=}$ *lonD*) und *lonV* aus *M. xanthus* mit dem Genom von So ce56 wurden insgesamt fünf *lon*-homologe Gene im Genom von So ce56 identifiziert. Vergleiche der Aminosäuresequenzen der fünf homologen Lon-Proteasen aus So ce56 zeigten für Lon1, Lon2, Lon4 und Lon5 eine große Homologie zu BsgA, wohingegen Lon3 eine größere Homologie zu LonV aufwies. Dies wurde auch durch eine phylogenetische Analyse (siehe Abb. 3.13 auf Seite 82) weiter bestätigt. Eine Analyse der Genregionen von *lon1-5* im Vergleich

zu bekannten *lon*-Genregionen aus *M. xanthus*, *E. coli* und *B. subtilis* zeigte eine auffallende Homologie zwischen der *lon3*-Region von *So ce56* zu den *lon*-Regionen aus *E. coli* und *B. subtilis* sowie zur *lonV*-Region von *M. xanthus* (siehe 3.3.1.1 auf Seite 82). Diese vier *lon*-Genregionen wiesen eine gemeinsame genetische Organisation auf, in der nicht nur die *lon*-homologen Gene, sondern zum Teil auch die Lage und Orientierung der benachbarten Gene konserviert sind (siehe Abb. 3.14 auf Seite 83). In den vier Genomen wurden die *lon*-homologen Gene in Koorganisation mit *clpX*, *clpP* und *tig* gefunden.

Dies wurde als ein Beweis gewertet, dass im Gegensatz zu den Proteasen Lon1, Lon2, Lon4 und Lon5 die Lon3-Protease ebenfalls eine Rolle im vegetativen Lebenszyklus von *So ce56* spielt. Anhand der Homologien der anderen vier Lon-Proteasen zu BsgA ($\hat{=}$ LonD) aus *M. xanthus* wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese wichtige Funktionen während der Differenzierung von *So ce56* ausüben. Analysen des morphologischen Phänotypes bekräftigten später diese Hypothese (siehe 3.3.3.2 auf Seite 88).

Die intrazelluläre Protease BsgA von *M. xanthus* ist in die Kontrolle der Differenzierung involviert. Gill et al. (1993) vermuteten, dass die BsgA-Protease von *M. xanthus* die Halbwertszeit von Proteinen moduliert oder direkt mit einer Komponente des Transkriptionsapparates interagiert. Auch die Generierung eines Polypeptides durch Degradation durch die BsgA-Protease, welches als ein für die Differenzierung notwendiges Signal fungiert, wurde von Gill et al. (1993) nicht ausgeschlossen. Die Lon-Proteasen Lon1, Lon2, Lon4 und Lon5 in *So ce56* könnten ähnliche Funktionen wie BsgA in *M. xanthus* ausüben.

Um diese Charakteristika auch in *So ce56* zu untersuchen, wurden Mutanten konstruiert, die aus einer homologen Rekombination (*single-crossover*) des jeweiligen Konjugationsplasmids in das Chromosom resultierten. Durch die Integration des jeweiligen Plasmids wurden die entsprechenden Gene unterbrochen. In *M. xanthus* sind verschiedene *bsgA*-Mutanten ($\hat{=}$ *lonD*) bekannt, deren Mutation häufig durch Punktmutation, aber auch durch Deletionen und *frameshifts* hervorgerufen wurden (Gill & Cull 1986). Der morphologische Phänotyp zeigte einen frühen Defekt in der Differenzierung und war bei allen identisch.

4.3.1 Phänotypische Charakterisierung der *lon1-5*- Mutanten von *So ce56*

Untersuchungen des vegetativen Wachstums zeigten, dass nur die *lon4*-Mutante von *So ce56* einen Wachstumsdefekt aufwies. Die anderen Mutanten zeigten ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum. Bisher wurde noch kein Wachstumsdefekt einer *lon*-Mutante in der Literatur beschrieben (siehe Tab. 4.1). Theoretisch könnten sich demnach durch Fehlen einer funktionellen Lon4-Protease cytotoxische Bestandteile während des vegetativen Wachstums in der Zelle anhäufen, welche in Anwesenheit von Lon4 von dieser degradiert würden. Folglich könnte die Lon4-Protease schon unter vegetativen Bedingungen eine Rolle für das Überleben der Zelle spielen. Wie zuvor erwähnt, wurde anhand der Vergleiche der Genregionen und des phylogenetischen Stammbaumes jedoch vielmehr die Lon3-Protease als potenziell für das vegetative Wachstum erforderliche Lon-Protease angesehen. Indes wurde für Lon4 postuliert, dass diese in die Differenzierung involviert ist. Beide Möglichkeiten können nicht ausgeschlossen werden. Im

Tabelle 4.1: Auflistung einiger morphologischer Phänotypen von *lon*-Mutanten (Δlon) verschiedener Organismen

Organismus	Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	UV-Sensitivität; mukoide Koloniemorphologie	Howard-Flanders et al. (1964); Gottesman & Zipser (1978)
<i>Pseudomonas syringae</i>	UV-Sensitivität; vierfach größere Zellen	Bretz et al. (2002)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	UV-Sensitivität; Lyse durch Polymixin B und $\text{pH} \geq 3,5$; keine Temperatur-Sensitivität	Takaya et al. (2002)
<i>Mycococcus xanthus</i>	keine Fruchtkörper- und Sporenbildung	Gill & Bornemann (1988)
<i>Bacillus subtilis</i>	keine Unterschiede zum Wildtyp	Schmidt et al. (1994); Serrano et al. (2001)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	UV-Sensitivität; Verlängerung der vegetativen Zellen (Ähnlichkeit zu den Schwärmerzellen)	Stewart et al. (1997)

Hinblick auf die Lon3-Protease kann vermutet werden, dass diese nicht für essentiell wichtige Degradationsvorgänge in der Zelle benötigt wird und aufgrund dessen kein Wachstumsdefekt unter vegetativen Bedingungen ersichtlich ist. Da die *lon3*-Mutante ebenfalls nicht in der Lage ist, Fruchtkörper zu bilden, ist auch eine Funktion der Lon3-Protease während der morphologischen Differenzierung nicht ausgeschlossen. Des Weiteren kann für die Lon4-Protease abgeleitet werden, dass diese möglicherweise sowohl für den vegetativen Lebenszyklus als auch für die Differenzierung benötigt wird.

Für die Analyse des Differenzierungs-Phänotyps der verschiedenen *lon*-Mutanten von So ce56 wurden diese hinsichtlich der morphologischen und physiologischen Differenzierung getestet. Damit sollte geklärt werden, ob durch die Mutation in dem jeweiligen Gen eine oder beide Differenzierungsarten beeinflusst werden. Es konnte anhand von Differenzierungsassays gezeigt werden, dass alle fünf *lon*-Mutanten sowohl im Vergleich zum Wildtyp So ce56 als auch untereinander unterschiedliche Phänotypen zeigten (siehe 3.3.3.2 auf Seite 88). Keine der Mutanten erreichte die letzte Phase der Differenzierung (siehe 3.3 auf Seite 68). In Anbetracht der Tatsache, dass die *lon4*-Mutante unter vegetativen Bedingungen einen Wachstumsdefekt aufwies, war es nicht verwunderlich, dass diese Mutante sehr früh in der Differenzierung inhibiert war und keinerlei Anzeichen der Aggregation zeigte. Gill & Bornemann (1988) konnten für verschiede-

ne *bsgA*-Mutanten ($\hat{=}$ *lonD*) von *M. xanthus* einen ähnlich ausgeprägte Phänotyp zeigen. Die *bsgA*-Mutanten von *M. xanthus* sind sehr früh in der Differenzierung inhibiert und zeigen keine Bildung von Aggregaten und dementsprechend auch keine Ausbildung von Fruchtkörpern und Myxosporen unter Nährstoffmangelbedingungen. Das Ergebnis des Differenzierungsassays der *lon*-Mutanten stützt weiterhin die Annahme, dass auch in *So ce56* die Lon-Proteasen in der multizellulären Differenzierung eine wichtige Funktion ausüben. Inwiefern die Proteasen durch direkte oder indirekte Degradation bestimmter Substrate die Signalkaskade der Differenzierung beeinflussen, ist nicht geklärt. Untersuchungen in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien ergaben, dass Lon-Proteasen an vielen Kontrollvorgängen in der Zelle beteiligt sind. Unter anderem kann eine Involvierung an folgenden Prozessen nachgewiesen werden:

- posttranslationale Qualitätskontrolle (Wickner et al. 1999)
- Zellteilung in *E. coli* (Schoemaker et al. 1984)
- Synthese kapsulärer Polypeptide in *E. coli* (Torres-Cabassa & Gottesman 1987)
- Sporulation in *B. subtilis* (Schmidt et al. 1994)
- Verlauf des Zellzyklus in *Caulobacter crescentus* (Wright et al. 1996)
- Biosynthese lateraler Flagellen in *Vibrio parahaemolyticus* (Stewart et al. 1997)
- negative Regulation des Typ III Sekretionsprotein in *Pseudomonas syringae* (Bretz et al. 2002)
- durch Nährstoffmangel ausgelöste ribosomale Proteindegradation in *E. coli* (Kuroda et al. 2001)
- Proteindegradation des Antitoxins des Toxin-Antitoxin-Systems in *E. coli* (Christensen et al. 2004)

Bei einigen dieser Vorgänge konnte auch eine direkte Interaktion der Lon-Protease mit einem spezifischen Substrat nachgewiesen werden (siehe Tab. 1.1 auf Seite 9).

Des Weiteren wurden Lon-Proteasen in vielen Organismen, wie z. B. in *E. coli* (Chin et al. 1988) oder *M. xanthus* (Ueki & Inouye 2002) als Hitzeschockproteine identifiziert. Hitzeschockproteine dienen zur Stabilisierung zellulärer Proteine unter Stressbedingungen und schützen diese vor Denaturierung, oder sie beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom. Hitzeschockversuche (Wachstumsversuche nach 20minütigem Hitzeschock) mit *So ce56* und *Slon1-5* und eine nachfolgende Analyse des Proteinmusters via SDS-PAGE ergaben keine detektierbaren Besonderheiten in Form von stärkerer oder schwächerer Proteinbanden. Für nachfolgende Arbeiten würde sich eine Auftrennung der Zellextrakte über ein 2D-Gelelektrophorese-System anbieten, da im Proteom eventuell auftretende Unterschiede durch eine zweidimensionale Auftrennung besser sichtbar werden.

Zwei der fünf *lon*-Mutanten von So ce56 wiesen bezüglich der physiologischen Differenzierung eine starke Beeinträchtigung in der Produktion der Sekundärmetabolite Chivosazol und Etnangien auf (siehe 3.3.3.3 auf Seite 90). *Slon2* zeigte keine Produktion von Chivosazol, aber im Vergleich zum Wildtyp eine normale Produktion von Etnangien, wohingegen es sich für *Slon4* genau umgekehrt darstellte. In diesen beiden Fällen schien die Mutation eine Inhibierung der Produktion jeweils eines Sekundärmetaboliten hervorzurufen. Damit kann Lon2 als positiver Regulator der Chivosazol-Biosynthese und Lon4 als positiver Regulator der Etnangien-Biosynthese bezeichnet werden. In *M. xanthus* wurde der Effekt einer Mutation im *bsgA*-Gen auf die physiologische Differenzierung nie untersucht, da bis vor kurzem wenig über den Sekundärmetabolismus in *M. xanthus* bekannt war. Real-time RT-PCR-Analysen zur Bestimmung der relativen Expression des aus dem Chivosazol-Operon bekannten *chiB*-Gens ergaben, dass Lon2 schon auf transkriptioneller Ebene als positiver Regulator der Chivosazol-Biosynthese fungiert (siehe Abb. 3.20 auf Seite 91).

Anhand neuerer Studien an So ce56 konnte das DNA-Bindeprotein ChiR identifiziert werden, welches spezifisch mit dem Promotor des Chivosazol-Biosyntheseklusters interagiert und die Expression von Chivosazol positiv reguliert (Rachid et al. 2007). Des Weiteren zeigte die *chiR*-Mutante von So ce56 keine multizelluläre Differenzierung, woraus Rachid et al. (2007) schlossen, dass es sich bei ChiR um einen pleiotrophen Regulator handelt, der sowohl in der morphologischen als auch in der physiologischen Differenzierung involviert ist. Da beide Mutanten sowohl einen Defekt in der morphologischen Differenzierung als auch in der physiologischen Differenzierung zeigten, können sie somit als pleiotrophe Regulatoren angesehen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die anderen drei Mutanten *Slon1*, *Slon2* und *Slon3* nur einen Defekt in der morphologischen Differenzierung.

4.3.2 Regulation der *lon*- Expression in So ce56

Neben der Untersuchung der Rolle der Lon-Proteasen in der morphologischen und physiologischen Differenzierung erfolgte eine Analyse der Expression der *lon*-Gene unter Differenzierungsbedingungen. Von *M. xanthus* war dazu schon bekannt, dass sich die Expression von *bsgA* (\triangleq *lonD*) unter Differenzierungsbedingungen graduell erhöht (Gill & Bornemann 1988).

Bis auf *lon5* scheinen alle weiteren *lon*-Gene in So ce56 unter Nährstoffmangelbedingungen negativ reguliert zu werden, da die Realtime-RT-PCR-Daten eine Abnahme in der relativen Expression nach 3 h und 6 h Differenzierung ergaben. Das Gen *lon5* hingegen scheint konstitutiv exprimiert zu werden. Demnach wird während der Differenzierung von So ce56 schon auf transkriptioneller Ebene die Bildung der *lon*-Genprodukte negativ reguliert. Man kann jedoch nicht ausschließen, dass das vorhandene Protein nicht im Zuge einer posttranslationalen Regulation verändert wird. Da die *lon*-Mutanten von So ce56 einen Defekt in der Differenzierung aufwiesen, kann man anhand dieser Real-time RT-PCR-Daten mutmaßen, dass die Lon-Proteasen unter vegetativen Bedingungen für die Degradation abnormer Proteine zuständig sind, diese Funktion aber auch von anderen Proteasen übernommen werden kann. Des Weiteren lässt sich vermuten, dass die Lon-Proteasen erst durch eine durch Nährstoffmangel induzierte posttranslationale

Modifikation wichtige Funktionen in der Differenzierung übernehmen. Gill & Bornemann (1988) beschrieben relativ gleiche Mengen an BsgA-Protein sowohl in vegetativen als auch in sich differenzierenden Zellen bis zum Beginn der Fruchtkörperbildung. Nach Beginn der Fruchtkörperbildung kam es zu einer zweifachen graduellen Abnahme der Proteinmenge. Daraus folgerten Gill & Bornemann (1988), dass dies entweder auf eine physiologische Adaption als Antwort auf die Differenzierung, oder aber auf eine gesteigerte Aktivität von Proteasen in den Zellextrakten zurückzuführen ist. Tatsächlich fanden sie heraus, dass BsgA sensitiv gegenüber proteolytischem Abbau in Zellextrakten ist und dass die proteolytische Aktivität während der Differenzierung zunimmt. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte von Tojo et al. (1993) gezeigt werden, dass *bsgA* sowohl unter vegetativen Bedingungen exprimiert wird, als auch dass die Expression des Genes sich unter Differenzierungsbedingungen graduell erhöht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der *lon*-Gene unter Nährstofflimitierung bis auf eine Ausnahme negativ reguliert wurde. Diese Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu den für *bsgA* aus *M. xanthus* bekannten Ergebnissen einer positiven Regulation der Expression unter Differenzierungsbedingungen. Dennoch ist von *M. xanthus* bekannt, dass es während der Phase der Fruchtkörperbildung zu einer Abnahme der Menge an BsgA kommt und dies somit vermutlich nicht auf transkriptioneller, dafür aber auf posttranslationaler Ebene reguliert wird. Somit ist es denkbar, dass die Lon-Proteasen indirekt die Differenzierung von *So ce56* beeinflussen, indem sie unter Nährstoffmangelbedingungen für die Degradation von bestimmten Repressoren verantwortlich sind, die unter vegetativen Bedingungen die Transkription differenzierungsspezifischer Gene reprimieren.

4.4 Spezifische Substrate der Proteasen Lon1 und Lon2 und deren Rolle im Stickstoffmetabolismus

Lon-Proteasen sind in der Lage, spezifische und unterschiedliche Substrate zu degradieren (siehe Tab. 1.1 auf Seite 9). Zur Identifizierung potenzieller Substrate der Lon-Proteasen Lon1 und Lon2 wurden Zellen von *So ce56*, *Slon1* und *Slon2* unter normalen wie auch unter leichten Stickstoffmangelbedingungen angezogen. Durch Vergleiche der Bandenmuster des Proteoms via SDS-PAGE der verschiedenen Zellextrakte und nachfolgender MALDI-TOF-Analyse wurden potenzielle spezifische Substrate von Lon1 und Lon2 identifiziert.

In Proteinextrakten aus unter geringem Nährstoffmangel angezogenen Zellen der exponentiellen Phase von *Slon1* konnte die Glutamatdehydrogenase GdhA als potenzielles Substrat ermittelt werden (siehe Abb. 3.23(a) auf Seite 95). Die Glutamatdehydrogenase kommt in vielen Organismen vor und ist ein Enzym des Stickstoffmetabolismus. Sie katalysiert die Reaktion von Ammonium, α -Ketoglutarat und NAD(P)H zu Glutamat und NAD(P)⁺ und ist dadurch für die Assimilation bzw. Dissimilation von Ammonium von zentraler Bedeutung. Im Vergleich zum Wildtyp wurde eine Akkumulation von GdhA in der Membranfraktion von *Slon1* unter geringen Nährstoffmangelbedingungen detektiert. Bisherige Untersuchungen im Hinblick auf eine Identifizierung spezifischer Substrate von Proteasen wurden fast ausschließlich unter norma-

len Wachstumsbedingungen unternommen. Maurizi & Rasulo (2002) konnten zeigen, dass die denaturierte Glutamatdehydrogenase in *E. coli* von ATP-abhängigen Proteasen (vermutlich ClpAP) unter Nährstoffmangelbedingungen degradiert wird. Diese Ergebnisse deuteten an, dass die Glutamatdehydrogenase *in vivo* entweder durch Verlust von stabilisierenden Liganden oder durch Akkumulation von destabilisierenden Metaboliten in hungrigen Zellen sensibler auf die Degradation durch ATP-abhängige Proteasen reagiert. Eine Beteiligung der Lon-Protease an der Degradation der Glutamatdehydrogenase in *E. coli* wurde von ihnen ebenfalls nicht völlig ausgeschlossen, da Mutationen in den Proteasen ClpAP und Lon zu einer partiellen Stabilisierung der Glutamatdehydrogenase führten und die Degradation ATP-abhängig ist. Weichart et al. (2003) konnten ebenfalls in *E. coli* zeigen, dass die Glutamatdehydrogenase GdhA in der stationären Phase durch ClpAP degradiert wird, und auch Damerau & St John (1993) belegten schon zu einem früheren Zeitpunkt, dass die ClpAP-Protease wichtig für die Degradation von Differenzierungsproteinen in *E. coli* ist. Dies sind alles Hinweise auf ein Zusammenspiel mehrerer ATP-abhängiger Proteasen. Demnach kann auch in So ce56 eine Beteiligung der Lon1-Protease mit oder ohne ClpAP an der Degradation der GdhA nicht ausgeschlossen werden. Über den Mechanismus, der hinter der möglichen Degradation der GdhA durch die Lon1-Protease steckt, kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Denkbar wäre, wie bereits für *E. coli* und die ClpP-Proteasen berichtet, dass die Glutamatdehydrogenase stabilisierende Liganden unter Nährstoffmangelbedingungen verliert, oder aber dass sich unter diesen Bedingungen destabilisierende Metabolite in der Zelle anhäufen und GdhA daher sensibler auf die Degradation durch die Lon1-Protease reagiert. Um eine mögliche Interaktion zwischen Lon1-Protease und GdhA genauer zu untersuchen, müsste Lon1 zunächst überexprimiert und aufgereinigt werden, um dann biochemische Analysen der Aktivität von Lon1 durchzuführen. Des Weiteren könnten sogenannte Degradationsassays folgen, in denen aufgereinigte Lon1-Protease zu Zellextrakten oder zu ebenfalls aufgereinigter GdhA zugegeben wird.

Unter gleichen Bedingungen konnte in der cytoplasmatischen Fraktion die Glutaminsynthetase GlnA als potenzielles Substrat der Lon2-Protease in So ce56 bestimmt werden (siehe Abb. 3.23(b) auf Seite 95). Die Glutaminsynthetase ist ein Schlüsselenzym im Stickstoffmetabolismus (siehe 4.4.1.2) und ermöglicht die Bildung von Glutamin ausgehend von Glutamat und NH_4^+ . Weichart et al. (2003) berichteten, dass GlnA in Wildtyp-Zellen von *E. coli* in der stationären Phase reduziert vorliegt, wohingegen in Protease-Mutanten eine Akkumulation von GlnA auftrat. Daraus folgerten sie, dass GlnA ein spezifisches Substrat der ATP-abhängigen Proteasen darstellt. Die Degradation von GlnA und anderer Enzyme durch ATP-abhängige Proteasen wurde zuvor schon von Maurizi & Rasulo (2002) gezeigt. Auch in So ce56 scheint GlnA durch die ATP-abhängige Protease Lon2 degradiert zu werden. Des Weiteren ergaben Glutaminsynthetasetests unter gleichen Bedingungen mit der *lon2*-Mutante eine leichte Erhöhung der GS-Aktivität, die vermutlich durch eine verstärkte *glnA*-Expression hervorgerufen wurde (siehe 3.6 und 4.4.1.3 auf den Seiten 113 und 137), wodurch eine indirekte Einflussnahme von Lon2 auf GdhA auch nicht ausgeschlossen werden kann.

Unter den nährstoffreduzierten Bedingungen wurden in den Mutanten *Slon1* und *Slon2* keine weiteren Proteine per MALDI-TOF-Analyse identifiziert, da sich die Auswahl auf die stärksten Unterschiede im Proteinmuster beschränkte.

Im Laufe weiterer Untersuchungen wurde nach Isolierung putativer DNA-Bindeproteine aus stationären Zellextrakten von So ce56 und *Slon2* und späterer Auftrennung der gewonnenen Zellextrakte ein weiteres potenzielles Substrat der Lon2 Protease identifiziert (siehe Abb. 3.25 auf Seite 98). MALDI-TOF-Analysen des in der *lon2*-Mutante akkumulierten Proteins ergaben GlnB (P_{II}) als ein weiteres potenzielles Substrat von Lon2. Die Akkumulation von GlnB in Zellen von *Slon2* im Vergleich zum Wildtyp konnte durch *Western Blot*-Analysen bestätigt werden. Die Akkumulation von GlnB trat sowohl unter geringem Nährstoffmangel (S_{Ma}-Medium) als auch unter stringenteren Bedingungen (M-Diff) auf. Nach Analysen unter nativen Bedingungen konnte des Weiteren festgestellt werden, dass in *Slon2* nur die modifizierte/phosphorylierte Form von GlnB (P_{II}) detektierbar ist. Bisher wurde in *Corynebacterium glutamicum* eine Degradation des GlnB-homologen Proteins GlnK in Gegenwart von Ammonium beschrieben (Ströscher et al. 2004). An diesem Prozess der Degradation sind drei Proteasen beteiligt, FtsH und die beiden Clp-Proteasekomplexe ClpCP und ClpXP. Des Weiteren konnte in einer *ftsH2*-Mutante von *Synechocystis* sp. PCC 6803 eine Akkumulation von P_{II} gezeigt werden (Stirnberg et al. 2007). Die Autoren schlossen daraus, dass die FtsH2 möglicherweise in der globalen Regulation des Stickstoffmetabolismus involviert ist und in Cyanobakterien ein Zusammenhang zwischen Stickstoff und Proteinqualitätskontrolle besteht. Auch in So ce56 kann eine direkte Interaktion der Lon2-Protease mit dem P_{II}-Protein nicht ausgeschlossen werden. Doch zuvor sollten an dieser Stelle noch einige Fakten bezüglich der P_{II}-Proteine und des Stickstoffregulation erläutert werden.

4.4.1 P_{II} (GlnB) in So ce56

Die Proteine der P_{II}-Familie bilden *in vivo* Homotrimere, die sich aus den 12,5 kDa (ca. 120 Aminosäuren) Untereinheiten zusammensetzen. Die Untereinheiten enthalten jeweils sechs β -Faltblätter und zwei α -Helices, aus denen drei *loops* gebildet werden, der T-loop, der C-loop und der B-loop.

Entscheidend für die regulatorische Funktion von P_{II} ist eine Modifikation in der T-loop-Region (Arcondéguy et al. 2001). Aminosäurereste an der Spitze des T-loops können bei Änderungen des zellulären Kohlenstoff-Stickstoffgleichgewichtes kovalent modifiziert werden, wobei der Modifikationsgrad des P_{II}-Proteins in erster Linie vom zellulären Stickstoffgehalt abhängt. Je nach Stickstoffversorgung kann das P_{II}-Protein unmodifiziert, einfach-, zweifach- oder dreifach-modifiziert vorliegen. Die Art der Modifikation ist jedoch nicht universell. Folgende Modifikation sind bisher bekannt:

- Uridylylierung an der Aminosäure Tyr51 wie z. B. bei GlnB aus *E. coli* (Son & Rhee 1987)
- Phosphorylierung an der Aminosäure Ser49 wie z. B. im Falle von *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Forchhammer & Tandeau de Marsac 1994)
- Adenylylierung an der Aminosäure Tyr51 in Aktinobakterien (z. B. *Streptomyces coelicolor*) (Hesketh et al. 2002)

Des Weiteren sind Organismen bekannt, in denen das P_{II} -Protein offenbar nicht modifiziert wird. Dazu gehören die marinen Prochlorococcen (Palinska et al. 2002), die Firmibakterien (Detsch & Stülke 2003) und die Pflanzen (Smith et al. 2004).

Die Modifikation von P_{II} basiert auf der synergetischen Bindung von ATP und α -Ketoglutarat (Kamberov et al. 1995), wobei Letzteres als Signalmolekül des Kohlenstoffmetabolismus fungiert. Die ATP-Konzentration spiegelt wiederum den Energiehaushalt der Zelle wider. Die Bindung der beiden Effektormoleküle an die P_{II} -Proteine hängt stark voneinander ab. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von α -Ketoglutarat an die P_{II} -Proteine nur spezifisch verläuft, wenn ATP vorhanden ist (Kamberov et al. 1995).

Anhand von Genomanalysen von So ce56 wurde festgestellt, dass in der Aminosäuresequenz des P_{II} -Proteins von So ce56 sowohl das Tyr51 als auch das Ser49 vorhanden sind. Des Weiteren wurde ein Uridylyltransferase kodierendes Gen *glnD* im Genom von So ce56 identifiziert. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte zu diesem Zeitpunkt weder die Möglichkeit einer Uridylylierung an der Aminosäure Tyr51 noch eine Phosphorylierung an der Aminosäure Ser49 des P_{II} -Proteins von So ce56 ausgeschlossen werden. Denkbar erschien des Weiteren durch das Vorhandensein einer Uridylyltransferase und der Abundanz der Serin/Threonin-Proteinkinasen in So ce56, dass in unterschiedlichen Wachstumsphasen verschiedene Modifikationen des P_{II} -Proteins in So ce56 vorliegen könnten. Auf Grund dessen wurde die Modifikation von PII in So ce56 in allen Wachstumsphasen untersucht.

4.4.1.1 Phosphorylierung des P_{II} -Proteins in So ce56

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der P_{II} -Modifikation in Form einer Uridylylierung oder einer Phosphorylierung in Zellen von So ce56 ergaben in jeder Phase des Wachstums unter leicht nährstofflimitierenden Bedingungen eine Modifikation des P_{II} -Proteins in Form einer Phosphorylierung (siehe 3.5.3 auf Seite 103). Jedoch konnte keine Auftrennung des P_{II} -Proteins in die verschiedenen phosphorylierten Isoformen erzielt werden. Daher konnte nicht geklärt werden, ob die unter nativen Bedingungen detektierte phosphorylierte Form von P_{II} auf eine einfache oder eine mehrfache Phosphorylierung zurückzuführen ist. Mögliche Ursachen könnten einerseits die Wahl des Systems für die nicht-denaturierende Gelelektrophorese, andererseits aber auch die Wahl der Anzuchtbedingungen sein. In einigen Ansätzen des Demodifikationsassays von P_{II} aus So ce56 wurde schon ohne Behandlung die unphosphorylierte Form von P_{II} detektiert, so dass vermutlich die Bedingungen für eine vollständige Phosphorylierung des P_{II} -Proteins aus So ce56 noch nicht gegeben waren. Eine weitere Erklärung könnte jedoch auch sein, dass die phosphorylierten Isoformen des P_{II} -Proteins nicht stabil sind, da die Phosphorylierung kooperativ verläuft.

Die detektierte Dephosphorylierung des P_{II} -Proteins durch die alkalische Phosphatase deckt sich mit den aus Cyanobakterien gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der Modifikation von P_{II} (Forchhammer & Tandeau de Marsac 1994). Inwieweit dies ebenfalls auf eine Phosphorylierung der Aminosäure Ser49 zurückzuführen ist, sollte in weiteren Arbeiten geklärt werden. Da jedoch

eben diese Aminosäure auch in P_{II} von So ce56 vorliegt, kann vermutet werden, dass diese auch in diesem Fall Angriffspunkt der Phosphorylierung ist.

Trotz Identifizierung von GlnD (Uridylyltransferase) und des Tyr51 wurde anhand der Versuche nur eine Phosphorylierung des P_{II} -Proteins festgestellt.

4.4.1.2 Stickstoffregulation in *E. coli* und So ce56

Die Signaltransduktionsproteine der P_{II} -Familie nehmen eine zentrale Rolle in der Koordination des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus ein. Das am Besten untersuchte P_{II} -System ist in *E. coli* zu finden. Hier spielt das P_{II} -Protein (GlnB) eine große Rolle in der Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität und steuert die Stickstoffregulation über Modulation der Aktivität und Expression vieler Komponenten des Stickstoffmetabolismus (Ninfa & Jiang 2005) (siehe Abb. 4.4). Als Signale der zellulären Stickstoff- und Kohlenstoffkonzentrationen in *E. coli* regulieren Glutamin und α -Ketoglutarat den Adenylylierungsgrad der Glutaminsynthetase und den Phosphorylierungsgrad des Transkriptionsfaktors NtrC aus dem NtrB/NtrC-Zweikomponentensystem, und somit die Aktivität dieser beiden Proteine (Ninfa & Jiang 2005).

Änderungen im zellulären Glutaminspiegel werden durch das bifunktionale Enzym Uridylyltransferase/Uridylylremovase (UTase/UR; *glnD*) registriert (Jiang et al. 1998a), während Änderungen im α -Ketoglutaratspiegel durch das P_{II} -Protein wahrgenommen werden. Als Antwort auf Stickstoffmangel sinkt der zelluläre Glutaminspiegel, α -Ketoglutarat akkumuliert, die UTase-Aktivität des GlnD-Proteins wird aktiviert und das P_{II} -Protein daraufhin uridylyliert. Die Uridylylierung kann nur erfolgen, wenn ATP und α -Ketoglutarat an das P_{II} -Protein gebunden sind, da dies die ausreichende Verfügbarkeit von Kohlenstoffgerüsten in der Zelle anzeigt. Das uridylylierte Protein stimuliert nun seinerseits über Interaktion mit dem bifunktionalen

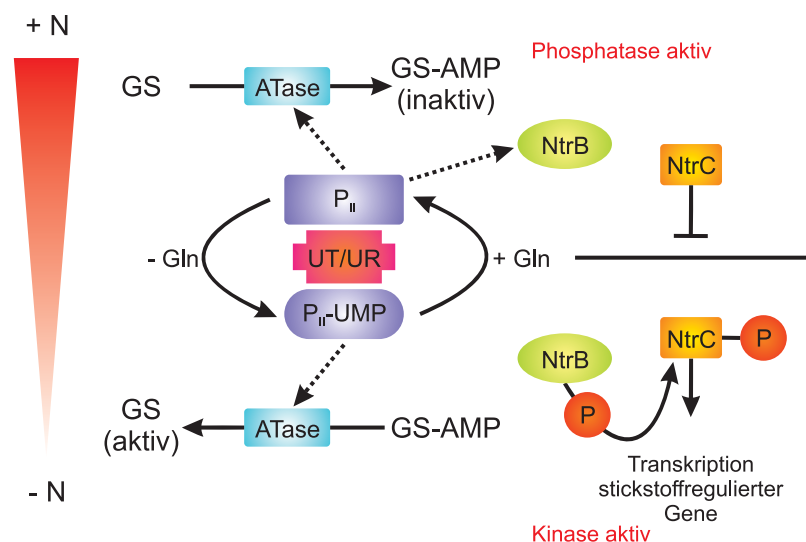


Abbildung 4.4: Modell des P_{II} -Systems in der globalen Stickstoffkontrolle in *E. coli*. Die gestrichelten Pfeile stehen für eine direkte Protein-Protein-Interaktion. GS: Glutaminsynthetase; UT/UR: Uridylyltransferase/Uridylylremovase; ATase: Adenylyltransferase (entnommen aus Moorhead & Smith (2003)).

Enzym Adenylyltransferase (ATase) die Deadenylylierung der Glutaminsynthetase. Durch die Entfernung der Adenylylgruppen wird diese aktiviert.

Ist die Umgebung dagegen reich an Stickstoff, so führt dies zu einer Erhöhung des zellulären Glutaminspiegels, wodurch die Uridylylremovase-Aktivität der UTase/UR aktiviert wird und modifiziertes P_{II} (P_{II} -UMP) deuridylyliert wird. Dadurch kann P_{II} das Enzym Adenylyltransferase binden (Jaggi et al. 1997). Die Komplexbildung von P_{II} und Adenylyltransferase führt zur Stimulation der Adenylyltransferase-Aktivität, die wiederum durch Adenylylierung der Glutaminsynthetase diese inaktiviert.

Die Signalweiterleitung dieses regulatorischen Systems erfolgt auf transkriptioneller Ebene über das Zwei-Komponenten-System NtrC/NtrB, welches über P_{II} und den zellulären α -Ketoglutarat Spiegel reguliert wird. Deuridylyliertes P_{II} aktiviert durch Bindung an die Sensorkinase NtrB deren Phosphatase-Aktivität, worauf NtrB den *response*-Regulator und Transkriptionsaktivator NtrC durch Dephosphorylierung inaktiviert (Jiang et al. 1998b). Durch die Inaktivierung kann NtrC nicht mehr an die Promotoren der stickstoffregulierten Gene wie z. B. *glnA* binden, wodurch diese nicht exprimiert werden. Eine Komplexbindung von P_{II} und NtrB unter stickstoffreichen Bedingungen ist jedoch nur möglich, wenn der α -Ketoglutarat Spiegel niedrig ist und somit nur ein Molekül α -Ketoglutarat an P_{II} gebunden hat. Indes signalisiert ein hoher α -Ketoglutarat Spiegel der Zelle einen Überschuss an Kohlenstoff und führt zur Besetzung von mehr als einer α -Ketoglutarat-Bindestelle. Dadurch wird eine Interaktion von P_{II} und NtrB verhindert und NtrB ist in der Lage, den Transkriptionsaktivator NtrC zu phosphorylieren. Diese phosphorylierte Form von NtrC fungiert als Transkriptionsaktivator und aktiviert so unter anderem die *glnA*-Expression. Unter Stickstoffmangelbedingungen hingegen liegt P_{II} modifiziert vor und kann nicht mit NtrB interagieren, wodurch NtrB den Transkriptionsaktivator NtrC phosphoryliert. Das phosphorylierte NtrC induziert daraufhin die Transkription der stickstoffregulierten Gene.

Von einem Modell der Stickstoffregulation in *So ce56* wie für *E. coli* beschrieben ist man noch weit entfernt. In dem am Besten untersuchtesten Myxobakterium *M. xanthus* konnten bis auf *glnA* keine weiteren an der Stickstoffregulation beteiligten Gene gefunden werden (siehe dazu auch 1.4 auf Seite 11). In *So ce56* konnten jedoch, neben den in Tabelle 1.2 auf Seite 11 aufgezählten Genen, weitere Gene gefunden werden, die NtrC-homologe Proteine kodieren. Da diese Gene zahlreich im Genom vertreten sind, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welches dieser Gene tatsächlich ein NtrC-homologes Protein in *So ce56* kodiert. *So ce56* nimmt unter den Myxobakterien die Vorreiterrolle hinsichtlich der Stickstoffregulation ein, da in *M. xanthus* keinerlei Hinweise auf ein globales Stickstoffregulationssystem gefunden wurden. Da die Stoffwechselwege der Stickstoffregulation von *So ce56* nicht geklärt sind, kann keine konkrete Aussage darüber getroffen werden, wo der Schwerpunkt der Stickstoffregulation liegt. So sind noch Fragen offen, inwieweit *So ce56* den von Enterobakterien bekannten Glutamatdehydrogenase-Weg als Alternative nutzt, oder ob die Transkription der stickstoffregulierten Gene ebenso wie in Enterobakterien über das Zwei-Komponenten-System NtrB/NtrC aktiviert wird. Vielleicht gleicht der Stickstoffmetabolismus aber auch dem der Cyanobakterien und *So ce56* nutzt für die

Stickstoffassimilation nur den GS/GOGAT-Weg, die Transkription der stickstoffregulierten Gene wird anstatt durch NtrB/NtrC durch den Transkriptionsaktivator NtcA aktiviert (Vega-Palas et al. 1992) und anstelle einer Adenylylierung der Glutaminsynthase erfolgt die Regulation über Inaktivierungsfaktoren (García-Domínguez et al. 1999). Genomanalysen ergaben Ähnlichkeiten zu beiden Arten der Stickstoffregulation. So ist es durch das Vorhandensein der GdhA durchaus möglich, dass So ce56 auch den alternativen Weg der Stickstoffassimilation nutzt. Die Identifizierung vieler *ntrC*-homologer Gene schließt auch eine Regulation der stickstoffregulierten Gene über ein NtrB/NtrC-homologes System nicht aus. Des Weiteren konnten drei *ntcA*-homologe Gene identifiziert werden und im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass P_{II} wie in Cyanobakterien phosphoryliert wird.

Auf Grund der bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Lon-Proteasen in So ce56 scheinen auch diese eine wichtige Rolle im Stickstoffmetabolismus einzunehmen. Durch die Identifizierung stickstoffregulierter Proteine als mögliche Substrate der Lon-Proteasen Lon1 und Lon2 kann eine Funktion der Lon-Proteasen im Stickstoffmetabolismus von So ce56 nicht außer Acht gelassen werden. Des Weiteren konnten Wachstumsversuche von So ce56, *Slon1* und *Slon2* unter verschiedenen Stickstoffbedingungen und mit verschiedenen Stickstoffquellen eindeutig zeigen, dass die Protease-Mutanten unter starker Stickstofflimitierung einen Wachstumsdefekt aufwiesen und letztlich lysierten (siehe 3.5.3.1 auf Seite 107).

4.4.1.3 Erhöhte Glutaminsynthetaseaktivität in *Slon1* und *Slon2* unter Stickstofflimitierung

Die Ergebnisse des Glutaminsynthetasetests zeigten eine leichte Erhöhung der GS-Aktivität der Mutanten *Slon1* und *Slon2* im Vergleich zum Wildtyp So ce56 unter leicht stickstofflimitierenden Bedingungen. Es wird vermutet, dass dies durch eine verstärkte Genexpression von *glnA* hervorgerufen wurde. Es wurden jedoch bisher keine weiteren Studien zur Bestätigung dieser Hypothese unternommen. Des Weiteren ist aber auch eine erhöhte Glutaminsynthetaseaktivität denkbar, welche in *E. coli* im Allgemeinen auf einen Mangel an Glutamin zurückzuführen ist, wodurch die Glutaminsynthetase durch Abspaltung von AMP reaktiviert wird. Gleichzeitig induziert Stickstoffmangel die GS-Expression. Geht man davon aus, dass Lon1 und Lon2 eine Rolle im Stickstoffmetabolismus von So ce56 einnehmen, so kann dies hiermit weiter bestätigt werden. Für beide Proteasen könnte eine direkte oder indirekte Einflussnahme auf die für sie identifizierten Substraten vorliegen: So könnte z. B. eine indirekte oder direkte Regulation der Lon2-Protease über das P_{II}-Protein möglich sein (siehe vorherige Ergebnisse). Da in der Mutante nachweislich nur die phosphorylierte Form des P_{II}-Proteins akkumuliert und somit das System der Phosphorylierung/Dephosphorylierung an irgendeinem Punkt durch das Fehlen der Protease gestört wird, könnte P_{II}^{phos.} die Deadenylylierung der GS und somit deren Aktivierung stimulieren.

4.4.1.4 NtcA: ein weiteres potenzielles Substrat der Lon2-Protease?

Von der Lon-Protease BsgA (\triangleq LonD) aus *M. xanthus* ist aus neueren Studien (Nariya & Inouye 2006, Ueki & Inouye 2006) bekannt, dass MrpC als mögliches spezifisches Substrat für BsgA in Frage kommt und somit eine Rolle während der proteolytischen Prozessierung von MrpC in die aktivere Form MrpC2 spielt. MrpC ist in *M. xanthus* als ein Transkriptionsfaktor der CRP-Familie bekannt und spielt in Zusammenarbeit mit MrpA und MrpB eine wichtige Rolle in der Regulation der Differenzierung in *M. xanthus*. Während der frühen Differenzierung wird die *mrpAB*-Expression durch Signale aus der Umwelt aktiviert und die entsprechenden Genprodukte produziert. MrpB wird durch eine Phosphorylierung aktiviert und induziert die Expression von *mrpC*, dessen Genprodukt wiederum die eigene Transkription autoregulierte (Sun & Shi 2001, Nariya & Inouye 2006, Ueki & Inouye 2006). Unter vegetativen Bedingungen wird MrpC durch die Ser/Thr-Kinase Pkn14 phosphoryliert, wodurch die Initiation der Differenzierung unterblieb. Indes wird vermutet, dass unter Nährstofflimitierung MrpC nicht phosphoryliert wird und damit ein Angriffsziel für die Lon-Protease BsgA darstellt. MrpC wird demnach vermutlich durch BsgA proteolytisch zu MrpC2 prozessiert, welches eine hohe Affinität zu Promotoren bestimmter differenzierungsspezifischer Gene aufweist (Nariya & Inouye 2006, Ueki & Inouye 2006). MrpC aus *M. xanthus* weist mit 26 % Identität die größte Homologie zu NtcA aus *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 auf.

Der Transkriptionsfaktor NtcA kontrolliert in Cyanobakterien die Transkription der Stickstoff-assimilationsgene (z. B. *glnA*). NtcA gehört ebenso wie MrpC aus *M. xanthus* zur CRP/FNR-

NtcA (So ce56)	-----MM	MGKDAMARSV	RVQPGALGND	GGLDLLDSRKR	RVVRRGAIGN
NtcA (Synechococcus)	-----ML	ANENSLLTMTF	RELG-----S	GKLPLQ----	-----
MrpC (M. xanthus)	MHGFNRPLGP	IGSNVVAPLQ	TTSSGMMVTA	NKLVPGQE--	-----
NtcA (So ce56)	AASPATQSAL	ADGGTIQRVA	KGRHLVTQGD	AATALAMLSSL	GRVRLVRGMS
NtcA (Synechococcus)	-----	-----IEQFE	RGKTIFFPD	PAERVYLLVK	GAVKLSRVYE
MrpC (M. xanthus)	-----AIDF	KGYFKVESFP	HNSTIYRPGD	NTDRVYLLKS	GRVRLMRIGK
NtcA (So ce56)	DGRSLSLGYR	GAGDVLGEAA	LGG--VTAHR	ESAIATEDVE	ALLVPLATVR
NtcA (Synechococcus)	SGEEITVALL	RENSVFGVLS	LLTGQRSDRF	YHAVAFTPVQ	LFSPVPIEFMQ
MrpC (M. xanthus)	NSTRSVVSIL	RPGLDFGELF	RPE--GTPIE	EMAIAGEAE	VWSIEGRDFR
NtcA (So ce56)	NLMATDANFA	AAIVTTLVER	HTDTEERLAS	MLFRNVEARL	CEFLKKAATR
NtcA (Synechococcus)	KALIERPELA	NVMLQGLSSR	ILQTEMMIET	LAHRDMGSRL	VSFLLILCRD
MrpC (M. xanthus)	AQLEARPALA	VDVVRAYAER	VRALRKRVLG	LTFKEVPARL	ADTLTLVEA
NtcA (So ce56)	WGIPDPRGVL	ISAP-FTHQE	MASMIGSTRE	TVTLTLGLDLR	RKGVIEIDRR
NtcA (Synechococcus)	FGIPSPDGIT	IDLK-LSHQA	IAEAIGSTRV	TVTRLGLDLR	ESKLIAIHKK
MrpC (M. xanthus)	HGERCPHGGE	TDLRGITQQD	LADLVGASRS	FVSTLINEMK	REGVLGNVGR
NtcA (So ce56)	RIVVLDLDRDAL	KGRI----			
NtcA (Synechococcus)	RITVFNPVAL	SQQFS---			
MrpC (M. xanthus)	ILCVRDQKAL	RKIAGKEK			

Abbildung 4.5: Vergleich der NtcA/MrpC-Aminosäuresequenzen aus So ce56, *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 und *M. xanthus* (Altschul et al. 1997). Der Vergleich beginnt am N-terminalen Ende. In allen drei Organismen identische Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind blau markiert.

Familie bakterieller Transkriptionsfaktoren und enthält ein DNA-bindendes *helix-turn-helix*-Motiv in seiner C-terminalen Domäne (Vega-Palas et al. 1990, Vega-Palas et al. 1992). Das NtcA-Dimer bindet spezifisch an Promotoren, die die palindromische Erkennungssequenz GTAN₈TAC enthalten, welche in den meisten stickstoffregulierten Genen gefunden werden konnte (Herrero et al. 2001). In Cyanobakterien ist NtcA für die Transkription von Genen verantwortlich, die durch Ammonium reprimiert werden (Luque et al. 1994). Des Weiteren konnte in filamentösen Cyanobakterien (z. B. *Anabaena* sp. PCC7120) gezeigt werden, dass NtcA auch bei der Differenzierung zu Heterozysten eine Rolle spielt (Meeks & Elhai 2002) sowie dass NtcA sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungiert (Jiang et al. 1997). In So ce56 wurden insgesamt drei *ntcA*-homologe Gene identifiziert, wobei nur eines als *ntcA*-Gen annotiert ist. Das NtcA-Protein von So ce56 zeigt mit einer Identität von 29 % bzw. 31 % eine Homologie zu MrpC aus *M. xanthus* und NtcA aus *S. elongatus* sp. PCC 7942 (siehe auch Abb. 4.5). Knauber (2006) und Rachid et al. (2007) konnten zeigen, dass NtcA sowohl an den Promotor des *asgA*-Gens als auch des *chiv*-Operons bindet. Des Weiteren konnte Knauber (2006) demonstrieren, dass sich NtcA in der *stringent response*-Mutante *Srel* nicht von diesen Promotoren löst und dementsprechend keine *chiv*- und *asgA*-Expression erfolgte. NtcA scheint demnach in der Differenzierung von So ce56 als Repressor zu wirken.

Da in *M. xanthus* das NtcA-homologe MrpC das Substrat der Lon-Protease darstellt und in der *lon2*-Mutante von So ce56 keine Produktion von Chivosazol nachgewiesen wurde, könnte NtcA ebenfalls ein mögliches Substrat der Lon2-Protease darstellen. Ein mögliches Szenario einer Wechselwirkung zwischen NtcA und Lon2-Protease stellt sich wie folgt dar: An der Promotorregion des Chivosazol-Biosynthesecusters bindet sowohl NtcA als Repressor als auch der Aktivator und positiver Regulator der Chivosazolproduktion ChiR (siehe dazu 4.3.1 auf Seite 127 (Rachid et al. 2007)). Man kann vermuten, dass im Fall der *lon2*-Mutante entweder kein ChiR vorhanden ist oder aber NtcA in der Mutante akkumuliert. Eine Akkumulation von NtcA in der *lon2*-Mutante erschien zunächst wahrscheinlicher. Die im Rahmen dieser Arbeit deswegen durchgeführten Experimente, blieben ergebnislos, da *Western Blot*-Analysen, die über eine mögliche Interaktion von Lon und NtcA Aufschluss bringen sollten, mit dem verwendeten Antikörper gegen NtcA aus *Synechococcus elongatus* PCC 7942 nicht funktionierten. Es konnte zwar in der Positivkontrolle mit Proteinextrakten von *S. elongatus* NtcA detektiert werden, doch weicht die Homologie zu stark ab, als dass NtcA in Extrakten von So ce56 zu detektieren gewesen wäre (Daten nicht gezeigt). Ein NtcA-Antikörper von So ce56 könnte Aufschluss über eine mögliche Interaktion geben.

4.4.1.5 Einfluss von Lon1 und Lon2 auf die Stickstoffregulation in *S. cellulosum* So ce56

Basierend auf den gesammelten Ergebnissen kann man annehmen, dass die Lon-Proteasen Lon1 und Lon2 in den Stickstoffmetabolismus von So ce56 involviert sind. Als eine Art metabolisches und zugleich zu diesem Zeitpunkt noch wahrscheinlichstes Modell kann man annehmen, dass die Lon-Proteasen Lon1 und Lon2 nicht in der Lage sind, adäquat auf eine Stickstofflimitierung zu reagieren. Die *Slon1*- und *Slon2*-Mutante zeigten unter Stickstofflimitierung (1,2

mM KNO_3) einen Wachstumsdefekt, der damit erklärbar ist, dass diese Mutanten ein Problem mit der Reaktion auf Stickstoffmangel haben und somit Stickstoffquellen nicht effizient genutzt werden können (siehe Abb. 3.41 auf Seite 113). Die Akkumulation stickstoffregulierter Proteine in beiden Mutanten könnte demnach als eine Antwort auf Stickstoffstress erfolgen, indem die Expression stickstoffregulierter Gene verstärkt wird.

Alternativ könnte man davon ausgehen, dass eine direkte Interaktion zwischen den Lon-Proteasen und den identifizierten potenziellen Substraten besteht. Somit würde GdhA direkt von Lon1 sowie GlnA und $P_{II}^{phos.}$ direkt von Lon2 degradiert. Ferner könnten Repressoren bzw. Aktivatoren dieser Proteine von den Lon-Proteasen degradiert werden und es somit zu einer indirekten Einflussnahme der Lon-Proteasen auf die identifizierten potenziellen Substraten kommen.

In Abbildung 4.6 sind zwei der komplexeren Modelle für die Lon2-Protease grafisch dargestellt. Von beiden kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie sich im Laufe weiterer Untersuchungen als wahr erweisen. In der Annahme, dass die Regulation der Phosphorylierung/Dephosphorylierung von P_{II} in *So ce56* dem von Cyanobakterien bekannten Regulationsmodell (Forchhammer 1999) ähnelt, kann folgende mögliche Interaktion der Lon2-Protease in den Regulationsmechanismus abgeleitet werden:

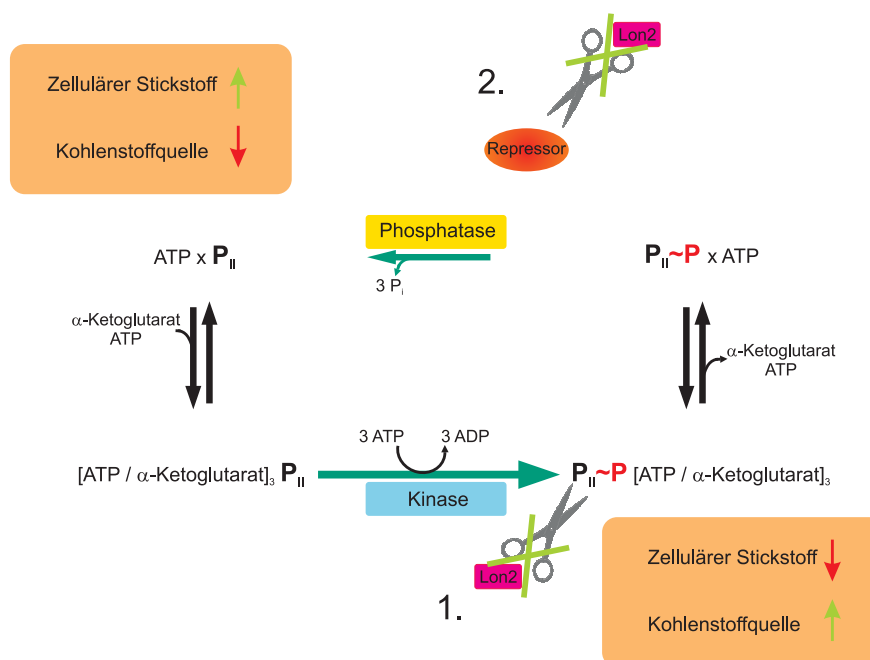


Abbildung 4.6: Modell der Regulation von Phosphorylierung/Dephosphorylierung des P_{II} -Proteins in Cyanobakterien. Die Bindung von α -Ketoglutarat und ATP an das P_{II} -Protein koordiniert die Interaktion von P_{II} mit der P_{II} -Kinase und der P_{II} -Phosphatase. *In vivo* ist stets ein Molekül ATP an P_{II} gebunden (Forchhammer 1999). Mit eingezeichnet sind die möglichen Stellen für die Interaktion der Lon2-Protease.

Für die *lon2*-Mutante von *So ce56* wurde festgestellt, dass die phosphorylierte Form des P_{II} -Proteins unter nährstoffarmen Bedingungen (vor allem geringe Mengen an Stickstoff) in dieser Mutante akkumulierte. Daher kann man folgern, dass die Lon2-Protease direkt an der Regu-

lation des phosphorylierten P_{II} -Proteins beteiligt ist. Das P_{II} -Protein wird in Cyanobakterien abhängig von der zellulären Kohlenstoff/Stickstoff-Balance durch die P_{II} -Kinase phosphoryliert. Der Modifikationsgrad von P_{II} ist dabei abhängig von dem zellulären α -Ketoglutaratspiegel, der, wie in *E. coli*, so auch in Cyanobakterien von P_{II} gemessen wird. In Cyanobakterien fungiert das α -Ketoglutarat sowohl als Kohlenstoffsignal, als auch als Stickstoffsignal. Bei guter Kohlenstoffversorgung oder Stickstofflimitierung steigt der α -Ketoglutaratspiegel an, wodurch letztlich, einhergehend mit einer Konformationsänderung des P_{II} -Proteins, dieses durch die Kinase phosphoryliert wird. Sinkt der α -Ketoglutaratspiegel wieder in Folge von Kohlenstofflimitierung oder Stickstoffüberschuss, wird durch die Bindung von α -Ketoglutarat an PII eine erneute Konformationsänderung hervorgerufen. Das phosphorylierte P_{II} wird von der Phosphatase erkannt und dephosphoryliert (Forchhammer 1999). Die Detektion der Akkumulation des phosphorylierten P_{II} -Proteins in *Slon2* kann auf eine direkte Interaktion der Lon2-Protease mit der phosphorylierten Form des P_{II} -Proteins zurückgeführt werden. Die Lon2-Protease wäre also für die Degradation der phosphorylierten P_{II} -Form zuständig, um das Gleichgewicht zwischen Phosphatase- und Kinaseaktivität zu halten. Ist Lon2 jedoch nicht in der Zelle vorhanden, akkumuliert die phosphorylierte Form des P_{II} -Proteins, welches in *Western Blot*-Analysen nachgewiesen werden konnte (siehe 3.4.2.1 auf Seite 97). In Folge der Stickstofflimitierung und zeitgleich mit der Phosphorylierung des P_{II} -Proteins liegt in der Zelle auch ein erhöhter α -Ketoglutaratspiegel vor. Infolge des an das phosphorylierte P_{II} unter Stickstofflimitierung gebundene α -Ketoglutarat wird die Phosphataseaktivität inhibiert. Als Ergebnis kann eine Akkumulation des phosphorylierten P_{II} -Proteins verzeichnet werden. Als weiteres Modell würde sich eine indirekte Einflussnahme der Lon2-Protease auf einen möglichen Repressor der Phosphatase oder aber auf einen Aktivator der Kinase anbieten. Bei Letzterem würde auch wieder die erhöhte Konzentration an α -Ketoglutarat dazu führen (siehe vorheriger Abschnitt), dass in der *lon2*-Mutante kein unphosphoryliertes P_{II} detektiert werden könnte. Bei Ersterem würde durch Fehlen der Lon2-Protease der Repressor der Phosphatase nicht degradiert werden, und die Phosphatase wäre somit inaktiv, weswegen auch in diesem Fall kein unphosphoryliertes P_{II} in der *lon2*-Mutante vorliegen würde.

4.4.2 Überexpression von Lon2

Eine gute Voraussetzung für die biochemische Charakterisierung von Proteinen ist die heterologe Überexpression und Aufreinigung des zu untersuchenden Proteins. Molekularbiologische und genetische Analysen der Lon-Proteasen in unterschiedlichen Organismen (z. B. *E. coli*) ergaben eine Peptidase- und Protease-Aktivität der Lon-Protease. Des Weiteren konnten in verschiedenen Organismen spezifische Substrate der Lon-Protease identifiziert werden (siehe Tab. 1.1 auf Seite 9). Um die Lon2-Protease aus So ce56 biochemisch charakterisieren zu können und eine mögliche Interaktion von Lon2 mit P_{II} weiter zu untersuchen, sollte die Lon2-Protease in *E. coli* überexprimiert werden.

Unter den verschiedenen getesteten Bedingungen konnte schließlich eine geringe Menge an Lon2 (88,6 kDa) aufgereinigt werden (siehe 3.7 auf Seite 116). Dabei wurde auch die Möglichkeit von *inclusion bodies* nicht außer Acht gelassen. Der nur geringen Überexpression von Lon2 aus So ce56 können verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Als Protease spielt Lon2 vermut-

lich eine entscheidende Rolle in der Regulation wichtiger Proteine in der Zelle. So können hohe Konzentrationen an Lon-Protease in der Zelle zu einer vermehrten Hydrolyse sowohl von abnormen als auch von essentiellen Proteinen führen (Goff & Goldberg 1987). Die daraus resultierende toxische Wirkung hoher Protease-Konzentrationen kann letztendlich zur Wachstumshemmung der Bakterien führen (Goldberg 1992). Goff & Goldberg (1987) beobachteten innerhalb von 20 Minuten einen Wachstumsstopp von *E. coli*, nachdem die Konzentration der Lon-Protease einen 3-5fach höheren Wert gegenüber der Ausgangskonzentration erreicht hatte. Eine Überexpression der Lon-Protease aus *E. coli* und der beiden Lon-Proteasen LonA und LonB aus *B. subtilis* verlief jedoch schon erfolgreich. Für die Überexpression von LonA und LonB aus *B. subtilis* wurde das gleiche Expressionssystem wie in dieser Arbeit verwendet. Des Weiteren kann die Effizienz der Überexpression von Strep-tag-Fusionsproteinen stark von der Faltung und Stabilität des Zielproteins abhängen (Skerra 1994, Degenkolb et al. 1991). Die niedrige Expression des Zielproteins kann dabei vermutlich auf eine Kombination aus Instabilität durch proteolytischen Abbau und einer toxischen Wirkung des Zielproteins auf *E. coli* zurückgeführt werden. Da in dieser Arbeit als Zielprotein eine Protease überexprimiert werden sollte, können zu hohe Konzentrationen der Protease im Cytoplasma einen Einfluss auf überlebenswichtige Funktionen in Form von übermäßiger Degradation wichtiger regulatorischer Proteine ausüben. Aufgrund dessen sollte ein Überexpressionsvektor konstruiert werden, der die Sekretion des überexprimierten Proteins in das Periplasma erlaubt. Da auch in diesem Fall das Strep-tag/StrepTactin-System verwendet werden sollte, sollte *lon2* in den Vektor pASK-IBA44 der Firma Iba kloniert werden. Bis zum Ende dieser Arbeit blieben die verschiedenen Klonierungsstrategien jedoch ergebnislos.

Möglichkeiten, die Überexpression positiv zu beeinflussen, gibt es viele. So wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst verschiedene Temperaturen für die Überexpression ausprobiert, was jedoch in keinem positiven Ergebnis bezüglich der Menge an überexprimierten Protein resultierte. Des Weiteren wurde die Überexpression in Minimalmedium untersucht (Novy et al. 2001), wobei gleichzeitig die Dauer der Überexpression verlängert wurde, da die Zellen eine höhere Verdopplungszeit aufwiesen. Hintergrund dieses Versuches war es, den Zellen zu ermöglichen, sich langsam an die möglicherweise toxischen Konzentrationen der Lon2-Protease zu gewöhnen. Ein entscheidender Erfolg blieb dabei jedoch aus. Eine Gewöhnung der Zellen an erhöhte Konzentrationen der Lon-Protease fand demnach nicht statt oder aber die Expression war unter diesen Mangelbedingungen zu gering, um große Mengen an Protein zu erhalten.

Die nach Aufreinigung des Lon2-Proteins erhaltenen Elutionsfraktionen enthielten nur geringe Mengen des überexprimierten Proteins. Des Weiteren zeigten sich nach der Aufreinigung über das Strep-tag/StrepTactin-System weitere Proteinbanden nach Auftrennung mittels SDS-PAGE, von denen im weiteren Verlauf vermutet wurde, dass es sich um Degradationsprodukte des Lon2-Proteins handelte. Die Elutionsfraktionen wurden im weiteren Verlauf zusammengeführt und dialysiert, um eine Aufkonzentrierung von Lon2 zu erlangen. Nach der Dialyse zeigte sich eine weitere Abnahme der Lon2-Proteinbande, verknüpft mit gleichzeitiger Zunahme von Degradationsprodukten. Nach Überexpression und Aufreinigung der archealen Lon-Protease aus *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 konnten ebenfalls weitere Proteinbanden detektiert werden, deren N-terminale Sequenz identisch zu dem N-Terminus der Lon-Protease war (Fukui et al. 2002).

Tabelle 4.2: Überblick über *rare codons* in *E. coli* und Anzahl vorhandener *rare codons* in Lon2 von So ce56

Aminosäure	Codon	Anteil [%] in allen Genen	Anteil [%] in Klasse II-Genen	Anzahl <i>rare</i> <i>codons</i> in Lon2
Arginin	AGG	2,2	0,3	1
Arginin	AGA	3,9	0,6	0
Arginin	CGA	6,5	1,1	1
Isoleucin	AUA	7,3	0,6	0
Leucin	CUA	3,7	0,8	0
Glycin	GGA	10,9	2,0	0
Arginin	CGG	9,8	0,8	24
Prolin	CCC	12,4	1,6	9

Daraus folgerten Fukui et al. (2002), dass es im Verlauf der Überexpression und Aufreinigung der Lon-Protease aus *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 zu einer partiellen Proteolyse oder zu einer Autolyse der Lon-Protease kam.

Neben der direkten toxischen Wirkung des Proteins auf die Zellen kann eine Überexpression von Fremdproteinen aber auch zu einer Beeinträchtigung des bakteriellen Metabolismus führen. Eine auf die Überexpression zurückgehende gesteigerte Proteinbiosynthese führt neben dem Verlust von Energiereserven in Form von ATP oder GTP zu einem Mangel des tRNA- bzw. Aminosäurepools (Glick 1995). Dies geschieht vor allem dann, wenn die für die Translation der Fremd-mRNA benötigten tRNA-Codons mit denen von *E. coli* differieren. Die manuelle Überprüfung aller in der *lon2*-Gensequenz enthaltenen Codons ergab, dass einige dieser sogenannten *rare codons* in der Sequenz vorliegen (siehe Tab. 4.2) Solche *rare codons* werden von *E. coli* selten für die Translation genutzt, da die entsprechenden tRNAs nur in geringen Mengen vorhanden sind. Dies kann im Verlauf der Translation unter anderem zu einer vorzeitigen Termination der Translation führen. Dies hat zur Folge, dass nur eine geringe oder keine Überexpression stattfindet (Novy et al. 2001), da die Translation der Lon2-Protease nur stattfinden kann, solange die seltenen tRNAs in *E. coli* vorhanden sind. Um diesem entgegen zu wirken, kam das Plasmid pRARE von der Firma Novagen zum Einsatz. Dieses wurde in den für die Überexpression genutzten *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Auf dem Vektor pRARE sind tRNA-Gene für alle in *E. coli* selten genutzten Aminosäurecodons kodiert. Durch deren Expression vom Vektor wird eine Beeinträchtigung der heterologen Expression durch Häufungen solcher *rare codons* im zu exprimierenden Gen vermieden. Doch auch diese Maßnahme resultierte in keiner gesteigerten Überexpression, es gestaltete sich im Gegenteil recht schwierig, den für die Überexpression genutzten *E. coli*-Stamm mit beiden Plasmiden (pRARE und pASK-IBA3 *lon2*-tag) zu kultivieren. Um dies zu umgehen, wurde ein Versuch mit einem speziell entwickelten *E. coli*-Stamm

(Rosetta) von der Firma Novagen gestartet. Dieser Stamm beinhaltete bereits das zuvor beschriebene Plasmid pRARE. Doch auch mit dieser Methode konnte das Wachstumsproblem der Überexpressionkulturen nicht gelöst werden. In Zusammenhang mit pRARE war in allen Fällen ein deutliches Wachstumsproblem der Überexpressionskulturen zu beobachten.

Letztendlich bleibt neben der erfolgreichen Klonierung des *lon2*-Gens in den pASK-IBA44-Vektor noch die Möglichkeit, ein anderes, eventuell auch eukaryotisches Expressionssystem zu verwenden sowie ein Austausch der *rare codons*.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Grundstock für weitere Arbeiten zur Stickstoffregulation in So ce56 gelegt, indem die verschiedenen stickstoffregulierten Gene identifiziert, die Modifikation des P_{II} -Proteins in So ce56 geklärt und eine Beteiligung der Lon-Proteasen im Stickstoffmetabolismus gezeigt wurde. Es ist noch einige Aufklärungsarbeit bezüglich der Rolle der Lon-Proteasen im Stickstoffmetabolismus von *S. cellulosum* So ce56 vonnöten, und auch die Untersuchung der Regulation des Stickstoffmetabolismus von So ce56 bedarf noch einiger Forschungsarbeit.

Eine Isolierung der Proteasen unter nativen Bedingungen wäre eine gute Voraussetzung für eine Funktions- und genaue Strukturanalyse der Enzyme. Neben dem Nachweis einer ATP-abhängigen Proteolyse sollte dann auch eine mögliche ATPase-Aktivität untersucht werden. Vor allem aber wäre eine Isolierung der Lon-Proteasen Lon1 und Lon2 von großer Wichtigkeit, um eventuelle Interaktionen mit den identifizierten Substraten zu überprüfen. In Anbetracht der Tatsache, dass für Lon1 und Lon2 etwaige Interaktionspartner schon identifiziert wurden, wäre es wünschenswert, die potenziellen Substrate der anderen drei Lon-Proteasen ebenfalls zu identifizieren und deren Spezifität zu überprüfen. Neben diesen elementaren Untersuchungen zum Verständnis der Funktion der Lon-Proteasen in So ce56 sollte auch der Stickstoffmetabolismus weiterführenden Analysen unterworfen werden. So sollte vor allem die Rolle des NtcA-Proteins aus So ce56 genauer untersucht werden. Weiterhin sollte die Funktion des P_{II} -Proteins genauer untersucht werden, da bisher weder bekannt ist, welcher Aminosäurerest durch P_{II} phosphoryliert wird, noch ob P_{II} in So ce56 als Kohlenstoff- oder Stickstoffsignal fungiert.

Mit der Etablierung eines Differenzierungsassays für *S. cellulosum* So ce56 ist ebenfalls weiterhin die Möglichkeit gegeben, die Differenzierung von So ce56 näher zu charakterisieren sowie weitere an der Differenzierung beteiligte Genprodukte zu identifizieren.

6 Zusammenfassung

Die komplexe Lebensweise von *S. cellulorum* So ce56 in Form eines vegetativen Lebenszyklus sowie der Fähigkeit zur multizellulären Differenzierung wirft unweigerlich die Frage auf, welche Signale für die Entscheidung zwischen vegetativem Wachstum und Differenzierung verantwortlich sind. Die vorliegende Arbeit sollte zur Charakterisierung der morphologischen Differenzierung in So ce56 und beteiligter Proteine beitragen. Für die Charakterisierung der morphologischen Differenzierung von So ce56 war zunächst die Etablierung eines geeigneten Nährstoffmangelmediums notwendig. Ferner wurden für die weitere Untersuchung der Differenzierung Mutanten konstruiert, die einen Defekt in der Differenzierung aufwiesen. Im Laufe der Arbeit verschob sich der Schwerpunkt auf die Beteiligung der Lon-Proteasen im Stickstoffmetabolismus von So ce56 und deren spezifischer Substrate.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass die Differenzierung von *S. cellulorum* So ce56 von einer drastischen Reduzierung der Nährstoffe sowie von einer bestimmten Zelldichte abhängig ist. Höhere Nährstoffkonzentrationen sowie eine geringere Zelldichte konnten die Differenzierung von So ce56 nicht initiieren. Zur weiteren Untersuchung der Differenzierung von So ce56 wurden differenzierungsdefekte Mutanten konstruiert. Analysen des Genoms von So ce56 ergaben Übereinstimmungen zu den aus *M. xanthus* bekannten und für die Differenzierung notwendigen Genen *asgA* und *bsgA* (\triangleq *lonD*). Es wurden ein *asgA*-homologes und fünf *lon*-homologe Gene identifiziert. Anhand von Expressionsstudien wurde für das *asgA*-Gen von So ce56 gezeigt, dass dessen Expression positiv unter Differenzierungsbedingungen reguliert wird. Weiterhin zeigte sich durch Expressionsstudien, dass die *asgA*-Expression abhängig von der stringenten Kontrolle ist. Für die Expression der Gene *lon1-4* wurde unter Differenzierungsbedingungen eine negative Regulation der Expression ermittelt, wohingegen *lon5* konstitutiv exprimiert wird. Morphologische Differenzierungsstudien der entsprechenden Mutanten ergaben, dass alle einen Defekt in der Differenzierung aufwiesen und die entsprechenden Genprodukte in der Differenzierung von So ce56 beteiligt sind. Untersuchungen dieser differenzierungsdefekten Mutanten hinsichtlich der Produktion der Sekundärmetabolite ergaben, dass Lon2 in der Chivosazol-Biosynthese und Lon4 in der Etnangien-Biosynthese involviert sind.

Im Verlauf der Untersuchungen wurden potenzielle Substrate der Lon-Proteasen Lon1 und Lon2 identifiziert, die allesamt im Stickstoffmetabolismus bekannter Bakterien, wie z. B. *E. coli* oder *S. elongatus*, involviert sind. Unter anderem konnte das P_{II}-Protein (GlnB) als potenzielles spezifisches Substrat der Lon2-Protease ermittelt werden. Analysen der Aminosäuresequenz von GlnB aus So ce56 ergaben, dass sowohl der für die Uridylylierung in *E. coli* wichtige Aminosäurerest Tyr51 als auch der für die Phosphorylierung in Cyanobakterien wichtige Aminosäurerest

Ser49 in So ce56 vorhanden sind. Genauere Untersuchungen der P_{II} Modifikationen in So ce56 ergaben eine Modifikation in Form einer Phosphorylierung des P_{II} -Proteins, womit die Modifikation der in Cyanobakterien gleicht. Durch die Identifizierung stickstoffregulierter Proteine als mögliche Substrate der Lon-Proteasen konnten erste Hinweise auf eine Beteiligung der Lon-Proteasen am Stickstoffmetabolismus gefunden werden. Vergleichende Wachstumsstudien mit den zwei untersuchten *lon*-Mutanten *Slon1* und *Slon2* mit viel und wenig Stickstoff zeigten einen Wachstumsdefekt unter Stickstofflimitierung. Die gesammelten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Lon-Proteasen entweder direkt über das mögliche Substrat oder aber indirekt in den Stickstoffmetabolismus von So ce56 involviert sind.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Ampere
aa	<i>amino acids</i> ; Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AHT	Anhydrotetrazyklin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
cm	Zentimeter
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser (hier: Reinstwasser)
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alteri (und andere)

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm; Erdbeschleunigung, Gravitationskonstante
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo
K	Kalium
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
μ	Mikro
m	Meter, Milli
<i>M.</i>	<i>Myxococcus</i>
<i>M. xanthus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
M	Molar (Mol pro Liter)
Mbp	Megabasenpaare
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Mg	Magnesium
min	Minute
mol	Mole ($6,023 \cdot 10^{23}$)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	Nano
Na	Natrium
nm	Nanometer
nt	Nukleotid

OD	optische Dichte
p	Pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
(p)ppGpp	Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat
ppGpp	Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat
Rb	Rubidium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolution per minute</i>)
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S.</i>	<i>Sorangium</i>
<i>S. cellulorum</i>	<i>Sorangium cellulorum</i>
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
Watt	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997), 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs', Nucleic Acids Res. **25**, 3389–3402.
- Arcondéguy, T., Jack, R. & Merrick, M. (2001), 'P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control', Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**, 80–105.
- Bennett, P. M., Grinsted, J. & Richmond, M. H. (1977), 'Transposition of TnA does not generate deletions', Mol. Gen. Genet. **154**, 205–211.
- Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B. & Müller, R. (1999), 'Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90', Biochim. Biophys. Acta **1445**, 185–195.
- Bibb, M. J. (2005), 'Regulation of secondary metabolism in streptomycetes', Curr. Opin. Microbiol. **8**, 208–215.
- Birnboim, D. & Doly, J. (1979), 'Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', Nucleic Acids Res. **6**, 1513–1522.
- Bradford, M. M. (1976), 'A rapid and sensitive method for quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein', Anal. Biochem. **72**, 248–254.
- Bretz, J., Losada, L., Lisboa, K. & Hutcheson, S. W. (2002), 'Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*', Mol. Microbiol. **45**, 397–409.
- Burbulys, D., Trach, K. A. & Hoch, J. A. (1991), 'Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay', Cell **64**, 545–552.
- Campos, J. M. & Zusman, D. R. (1975), 'Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3' : 5'-cyclic AMP, ADP, and nutrition', Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 518–522.
- Chandu, D. & Nandi, D. (2004), 'Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation', Res. Microbiol. **155**, 710–719.
- Chin, D. T., Goff, S. A., Webster, T., Smith, T. & Goldberg, A. L. (1988), 'Sequence of the *lon* gene in *Escherichia coli*', J. Biol. Chem. **263**, 11718–11728.

- Cho, K. & Zusman, D. R. (1999), 'AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*', Mol. Microbiol. **34**, 268–281.
- Christensen, S. K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K. & Van Melderen, L. (2004), 'Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli* : involvement of the *yefM-yoeB* toxin-antitoxin system', Mol. Microbiol. **51**, 1705–1717.
- Damerau, K. & St John, A. C. (1993), 'Role of Clp protease subunits in degradation of carbon starvation proteins in *Escherichia coli*', J. Bacteriol. **175**, 53–63.
- Davis, J. M., Mayor, J. & Plamann, L. (1995), 'A missense mutation in *rpoD* results in an A-signaling defect in *Myxococcus xanthus*', Mol. Microbiol. **18**, 943–952.
- Degenkolb, J., Takahashi, M., Ellestad, G. A. & Hillen, W. (1991), 'Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor', Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 1591–1595.
- Demain, A. L. (1998), 'Induction of microbial secondary metabolism', Internatl. Microbiol. **1**, 259–264.
- Detsch, C. & Stülke, J. (2003), 'Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB', Microbiology **149**, 3289–3297.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988), 'High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation', Nucleic Acids Res. **16**, 6127–6145.
- Downard, J., Ramaswamy, S. V. & Kil, K. S. (1993), 'Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development', J. Bacteriol. **175**, 7762–7770.
- Dunmire, V., Tatar, L. D. & Plamann, L. (1999), 'Genetic suppression analysis of an *asgA* missense mutation in *Myxococcus xanthus*', Microbiology **145**, 1299–1306.
- Dworkin, M. (1996), 'Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria', Microbiol. Rev. **60**, 70–102.
- Ebel, W., Skinner, M. M., Dierksen, K. P., Scott, J. M. & Trempy, J. E. (1999), 'A conserved domain in *Escherichia coli* lon protease is involved in substrate discriminator activity', J. Bacteriol. **181**, 2236–2243.
- Fisher, P. R. (2005), Microbial development, in 'Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine', Wiley-VCH.
- Flett, F., Mersinias, V. & Smith, C. P. (1997), 'High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes', FEMS Microbiol. Lett. **155**, 223–229.

- Forchhammer, K. (1999), The PII protein in *Synechococcus* PCC 7942 senses and signals 2-oxoglutarate under ATP-replete conditions, in 'The Phototrophic Prokaryotes', Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Forchhammer, K. (2004), 'Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets', FEMS Microbiol. Lett. **28**, 319–333.
- Forchhammer, K. & Hedler, A. (1997), 'Phosphoprotein PII from cyanobacteria: analysis of functional conservation with the PII signal-transduction protein from *Escherichia coli*', Eur. J. Biochem. **244**, 869–875.
- Forchhammer, K. & Tandeau de Marsac, N. (1994), 'The P_{II} protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status', J. Bacteriol. **176**, 84–91.
- Forchhammer, K. & Tandeau de Marsac, N. (1995), 'Functional analysis of the phosphoprotein P_{II} (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942', J. Bacteriol. **177**, 2033–2040.
- Fukui, T., Eguchi, T., Atomi, H. & Imanaka, T. (2002), 'A membrane-bound archaeal Lon protease displays ATP-independent proteolytic activity towards unfolded proteins and ATP-dependent activity for folded proteins', J. Bacteriol. **184**, 3689–3698.
- Gabain, A. V., Belasco, J. G., Schottel, J. L., Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. (1983), 'Decay of mRNA in *Escherichia coli*: Investigation of the fate of specific segments of transcripts', Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 653–657.
- García-Domínguez, M., Reyes, J. C. & Florencio, F. J. (1999), 'Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction', Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 7161–7166.
- Garza, A. G., Harris, B. Z., Greenberg, B. M. & Singer, M. (2000), 'Control of *asgE* expression during growth and development of *Myxococcus xanthus*', J. Bacteriol. **182**, 6622–6629.
- Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H. & Reichenbach, H. (1996), 'Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties.', J. Antibiot. **49**, 560–563.
- Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S. & Müller, R. (2003), 'Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities - past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*', J. Biotechnol. **106**, 233–253.
- Gill, R. E. & Bornemann, M. C. (1988), 'Identification and characterization of the *Myxococcus xanthus* *bsgA* gene product', J. Bacteriol. **170**, 5289–5297.
- Gill, R. E. & Cull, M. G. (1986), 'Control of developmental gene expression by cell-to-cell interactions in *Myxococcus xanthus*', J. Bacteriol. **168**, 341–347.

- Gill, R. E., Karlok, M. & Benton, D. (1993), 'Myxococcus xanthus encodes an ATP-dependent protease which is required for developmental gene transcription and intercellular signaling', J. Bacteriol. **175**, 4538–4544.
- Glick, B. R. (1995), 'Metabolic load and heterologous gene expression', Biotechnol. Adv. **13**, 247–261.
- Goff, S. A. & Goldberg, A. L. (1987), 'An increased content of protease La, the *lon* gene product, increases protein degradation and blocks growth in *Escherichia coli*', J. Bacteriol. **262**, 4508–4515.
- Goldberg, A. L. (1992), 'The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells', Eur. J. Biochem. **203**, 9–23.
- Gottesman, S. (1996), 'Proteases and their targets in *Escherichia coli*', Annu. Rev. Genet. **30**, 465–506.
- Gottesman, S. & Maurizi, M. R. (1992), 'Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets', Microbiol. Rev. **56**, 592–621.
- Gottesman, S. & Maurizi, M. R. (2001), 'Surviving starvation', Science **293**, 614–615.
- Gottesman, S. & Zipser, D. (1978), 'Deg phenotype of *Escherichia coli lon* mutants', J. Bacteriol. **133**, 844–851.
- Gray, W. D. (1949), 'Initial studies on the metabolism of *Hansenula anomala* (Hansen) Sydow', Am. J. Bot. **36**, 475–480.
- Hanahan, D. (1983), 'Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids', J. Mol. Biol. **166**, 557–580.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M. & Flores, E. (2001), 'Nitrogen control in cyanobacteria', J. Bacteriol. **183**, 411–425.
- Hesketh, A., Fink, D., Gust, B., Rexer, H.-U., Scheel, B., Chater, K., Wohlleben, W. & Engels, A. (2002), 'The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria', Mol. Microbiol. **2**, 319–330.
- Higgins, D. G., Bleasby, A. J. & Fuchs, R. (1992), 'CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment', Comput. Appl. Biosci. **8**, 189–191.
- Hoch, J. A. (2000), 'Two-component and phosphorelay signal transduction', Curr. Opin. Microbiol. **3**, 164–170.
- Howard-Flanders, P., Simson, E. & Theriot, L. (1964), 'A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in *Escherichia coli* K-12', Genetics **49**, 237–246.

- Hövel, S. (2002), Isolation und Charakterisierung der sporulationsspezifischen Protease LonB von *Bacillus subtilis*, PhD thesis, Philipps-Universität Marburg.
- Irmeler, A. & Forchhammer, K. (2001), 'A PP2C-type phosphatase dephosphorylates the PII signaling protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803', Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12978–12983.
- Jaggi, R., van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., Ollis, D. L. & Vasudevan, S. G. (1997), 'The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction', EMBO J. **16**, 5562–5571.
- Jiang, F., Mannervik, B. & Bergman, B. (1997), 'Evidence for redox regulation of the transcription factor NtcA, acting both as an activator and a repressor, in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120', Biochem. J. **327**, 513–517.
- Jiang, P., Peliska, J. A. & Ninfa, A. J. (1998a), 'Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein', Biochemistry **37**, 12782–12794.
- Jiang, P., Peliska, J. A. & Ninfa, A. J. (1998b), 'Reconstitution of the signal-transduction bi-cyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*', Biochemistry **37**, 12795–12801.
- Kaiser, D. (2004), 'Signaling in myxobacteria', Annu. Rev. Microbiol. **58**, 75–98.
- Kamberov, E. S., Atkinson, M. A. & Ninfa, A. J. (1995), 'The *Escherichia coli* signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP', J. Biol. Chem. **270**, 17797–17807.
- Kegler, C., Gerth, K. & Müller, R. (2006), 'Establishment of a real-time PCR protocol for expression studies of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in the G/C-rich myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56', J. Biotechnol. **121**, 201–212.
- Kessler, P. S., Daniel, C. & Leigh, J. A. (2001), 'Ammonia switch-off of nitrogen fixation in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*: Mechanistic features and requirement for the novel GlnB homologues, NifH₁ and NifH₂', J. Bacteriol. **183**, 882–889.
- Knauber, J. M. (2004), Untersuchungen zum genetischen Potential der Sekundärstoffbildung von *Sorangium cellulosum* So ce90 und Identifizierung des Spirangienbiosynthesegenclusters, PhD thesis, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- Knauber, T. (2006), Der Einfluss der stringenten Kontrolle auf die morphologische und physiologische Differenzierung in *Sorangium cellulosum* So ce56, PhD thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen.

- Kopp, M., Irschik, H., Gross, F., Perlova, O., Sandmann, A., Gerth, K. & Müller, R. (2004), 'Critical variations of conjugational DNA transfer into secondary metabolite multiproducing *Sorangium cellulosum* strains So ce12 and So ce56: development of a *mariner*-based transposon mutagenesis system', J. Biotechnol. **107**, 29–40.
- Kuner, J. M. & Kaiser, D. (1982), 'Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of *Myxococcus xanthus*', J. Bacteriol. **151**, 458–461.
- Kuroda, A. (2006), 'A polyphosphate-Lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation', Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**, 325–331.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. & Kornberg, A. (2001), 'Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*', Science **293**, 705–708.
- Kuspa, A. & Kaiser, D. (1989), 'Genes required for developmental signalling in *Myxococcus xanthus*: Three *asg* loci', J. Bacteriol. **171**, 2762–2772.
- Kuspa, A., Plamann, L. & Kaiser, D. (1992), 'Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*', J. Bacteriol. **174**, 3319–3326.
- Laemmli, U. K. (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', Nature **227**, 680–685.
- LaRossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoil, C. & Kaiser, D. (1983), 'Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants', J. Bacteriol. **153**, 1394–1404.
- Lengeler, J. W., Drews, G. & Schlegel, H. G. (1999), Biology of the prokaryotes, Thieme, Stuttgart, chapter 27, pp. 627–651.
- Li, Y. & Plamann, L. (1996), 'Purification and in vitro phosphorylation of *Myxococcus xanthus* AsgA protein', J. Bacteriol. **178**, 289–292.
- Ludwig, W., Schleifer, H. H., Reichenbach, H. & Stackebrandt, E. (1983), 'A phylogenetic analysis of the myxobacteria *Myxococcus fulvus* etc.', Arch. Microbiol. **135**, 58–62.
- Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. & Stock, J. B. (1992), 'Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors', Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 718–722.
- Luque, I., Flores, E. & Herrero, A. (1994), 'Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria', EMBO J. **13**, 2862–2869.
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H. & MacNeil, T. (1992), 'Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector', Gene **111**, 61–68.
- Magasanik, B. (2000), 'PII: a remarkable regulatory protein', Trends Microbiol. **8**, 447–448.

- Maheswaran, M. & Forchhammer, K. (2003), 'Carbon-source-dependent nitrogen regulation in *Escherichia coli* is mediated through glutamine-dependent GlnB signalling', Microbiology **149**, 2163–2172.
- Marahiel, M. A., Nakano, M. M. & Zuber, P. (1993), 'Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*', Mol. Microbiol. **7**, 631–636.
- Maurizi, M. R. (1992), 'Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*', Experientia **48**, 178–201.
- Maurizi, M. R. & Rasulova, F. (2002), 'Degradation of L-glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Allosteric regulation of enzyme stability', Arch. Biochem. Biophys. **397**, 206–216.
- Meeks, J. C. & Elhai, J. (2002), 'Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states', Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66**, 94–121.
- Merrick, M. J. & Edwards, R. A. (1995), 'Nitrogen control in bacteria', Microbiol. Rev. **59**, 604–622.
- Mizusawa, S. & Gottesman, S. (1983), 'Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of the Sula protein', Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 358–362.
- Müller, R. & Gerth, K. (2005), 'Development of simple media which allow investigations into the global regulation of chivosazol biosynthesis with *Sorangium cellulosum* So ce56', J. Biotechnol. **121**, 192–200.
- Moore, B. S. & Hertweck, C. (2002), 'Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units', Nat Prod Rep **19**, 70–99.
- Moorhead, G. B. G. & Smith, C. S. (2003), 'Interpreting the plastid carbon, nitrogen, and energy status. A role for PII', Plant Physiol. **133**, 492–498.
- Mori, E., Fulchieri, M., Indorato, C., Fani, R. & Bazzicalupo, M. (1996), 'Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Azospirillum brasilense lon* gene: involvement in iron uptake', J. Bacteriol. **178**, 3440–3446.
- Nariya, H. & Inouye, S. (2006), 'A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development', Mol. Microbiol. **60**, 1205–1217.
- Ninfa, A. J. & Jiang, P. (2005), 'PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism', Curr. Opin. Microbiol. **8**, 168–173.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K. & Mierendorf, R. (2001), 'Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression', inNovations **12**, 1–3.

- Pahel, G., Rothstein, D. M. & Magasanik, B. (1982), 'Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*', J. Bacteriol. **150**, 202–213.
- Palinska, K. A., Laloui, W., Bédu, S., Loiseaux-de Goer, S., Castets, A. M., Rippka, R. & Tandeau de Marsac, N. (2002), 'The signal transducer PII and bicarbonate acquisition in *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, a marine cyanobacterium naturally deficient in nitrate and nitrite assimilation', Microbiology **148**, 2405–2412.
- Pfaffl, M. W. (2001), 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', Nucleic Acids Res. **29**, 2002–2007.
- Plamann, L., Davis, J. M., Cantwell, B. & Mayor, J. (1994), 'Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*', J. Bacteriol. **176**, 2013–2020.
- Plamann, L., Kuspa, A. & Kaiser, D. (1992), 'Proteins that rescue A-signaling-defective mutants of *Myxococcus xanthus*', J. Bacteriol. **174**, 3311–3318.
- Plamann, L., Li, Y., Cantwell, B. & Mayor, J. (1995), 'The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development', J. Bacteriol. **177**, 2014–2020.
- Pope, M. K., Green, B. & Westpheling, J. (1998), 'The *bldB* gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in *Streptomyces coelicolor*', J. Bacteriol. **180**, 1556–1562.
- Pradella, S., Hans, A., Spröer, C., Reichenbach, H., Gerth, K. & Beyer, S. (2002), 'Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56', Arch Microbiol **178**, 484–492.
- Rachid, S., Gerth, K., Kochems, I. & Müller, R. (2007), 'Deciphering regulatory mechanisms for secondary metabolite production in the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56', Mol. Microbiol. **63**, 1783–1796.
- Reichenbach, H. (1974), 'Die Biologie der Myxobakterien', Biologie in unserer Zeit **4**, 33–45.
- Reichenbach, H. (1993), 'Biologically active secondary metabolites from myxobacteria', Biotech. Adv. **11**, 219–277.
- Reichenbach, H. (2001), 'Myxobacteria, producers of novel bioactive substances', J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **27**, 149–156.
- Reichenbach, H. & Dworkin, M. (1991), The Prokaryotes, Springer-Verlag, chapter 118, pp. 3416–3488.
- Rosenberg, E., Vaks, B. & Zuckerberg, A. (1973), 'Bactericidal action of an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus*', Antimicrob. Agents Chemother. **4**, 507–513.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn, Cold Spring Harbor.
- Sarao, R., McCurdy, H. D. & Passador, L. (1985), 'Enzymes of the intermediary carbohydrate metabolism of *Polyangium cellulosum*', Can. J. Microbiol. **31**, 1142–1146.
- Schmidt, R., Decatur, A. L., Rather, P. N., Moran Jr, C. P. & Losick, R. (1994), 'Bacillus subtilis Lon protease prevents inappropriate transcription of genes under the control of the sporulation transcription factor σ^G ', J. Bacteriol. **176**, 6528–6537.
- Schoemaker, J. M., Gayda, R. C. & Markovitz, A. (1984), 'Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the Sula protein, a key to lon-associated filamentation and death', J. Bacteriol. **158**, 551–561.
- Seeburg, P. H., Matrial, J. A., Baxter, J. D. & Goodman, H. M. (1977), 'Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone', Nature **270**, 486–494.
- Serrano, M., Hövel, S., Moran Jr, C. P., Henriques, A. O. & Völker, U. (2001), 'Forespore-specific transcription of the *lonB* gene during sporulation in *Bacillus subtilis*', J. Bacteriol. **183**, 2995–3003.
- Shigekawa, K. & Dower, W. J. (1988), 'Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells', BioTechniques **6**, 742–751.
- Shimkets, L. J., Dworkin, M. & Reichenbach, H. (2006), The Myxobacteria, in 'The Prokaryotes', Springer New York.
- Silakowski, B., Kunze, B. & Müller, R. (2001), 'Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*', Gene **275**, 233–240.
- Simon, R., O'Connell, M., Lables, M. & Pühler, A. (1986), 'Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other Gram-negative bacteria', Meth. Enzymol. **118**, 643–659.
- Singer, M. & Kaiser, D. (1995), 'Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*', Genes Dev. **9**, 1633–1644.
- Singh, B. N. (1947), 'Myxobacteria in solis and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria', J. Gen. Microbiol. **1**, 1–10.
- Skerra, A. (1994), 'Use of the tetracycline promotor for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*', Gene **151**, 131–135.
- Smith, C. S., Morrice, N. A. & Moorhead, G. B. G. (2004), 'Lack evidence for phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* PII: implications for plastid carbon and nitrogen signalling', Biochim. Biophys. Acta. **1699**, 145–154.

- Sogaard-Andersen, L., Overgaard, M., Lobedanz, S., Ellehauge, E., Jelsbak, L. & Rasmussen, A. A. (2003), 'Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*', Mol. Microbiol. **48**, 1–8.
- Son, H. S. & Rhee, S. G. (1987), 'Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase', J. Biol. Chem. **262**, 8690–8695.
- Stadtman, E. R., A., G., Ciardi, J. E., Yeh, J., Hennig, S. B. & Shapiro, B. M. (1970), 'Multiple molecular forms of glutamine synthetase produced by enzyme catalyzed adenylation and deadenylation reactions', Adv. Enzyme Regul. **8**, 99–118.
- Stewart, B. J., Enos.Berlage, J. L. & McCarter, L. L. (1997), 'The *lonS* gene regulates swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*', J. Bacteriol. **179**, 107–114.
- Stirnberg, M., Fulda, S., Huckauf, J., Hagemann, M., Krämer, R. & Marin, K. (2007), 'A membrane-bound FtsH protease is involved in osmoregulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803: the compatible solute synthesizing enzyme GgpS is one of the targets for proteolysis', Mol. Microbiol. **63**, 86–102.
- Strösser, J., Lüdke, A., Schaffer, S., Krämer, R. & Burkovski, A. (2004), 'Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*', Mol. Microbiol. **54**, 132–147.
- Sun, H. & Shi, W. (2001), 'Genetic studies of *mrp*, a locus essential for cellular aggregation and sporulation of *Myxococcus xanthus*', J. Bacteriol. **183**, 4786–4795.
- Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E. & Yamamoto, T. (2005), 'Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression', Mol. Microbiol. **55**, 839–852.
- Takaya, A., Tomoyasu, T., Tokumitsu, A., Morioka, M. & Yamamoto, T. (2002), 'The ATP-dependent Lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1', J. Bacteriol. **184**, 224–232.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994), 'CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice', Nucleic Acids Res. **22**, 4673–4680.
- Tojo, N., Inouye, S. & Komano, T. (1993), 'The *lonD* gene is homologous to the *lon* gene encoding an ATP-dependent protease and is essential for the development of *Myxococcus xanthus*', J. Bacteriol. **175**, 4545–4549.
- Torres-Cabassa, A. S. & Gottesman, S. (1987), 'Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis', J. Bacteriol. **169**, 981–989.

- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G. & Van Melderen, L. (2006), 'Biological roles of the ATP-dependent protease', Res. Microbiol. **157**, 701–713.
- Ueki, T. & Inouye, S. (2002), 'Transcriptional activation of a heat-shock gene, *lonD*, of *Myxococcus xanthus* by a two component histidine-aspartate phosphorelay system', J. Biol. Chem. **277**, 6170–6177.
- Ueki, T. & Inouye, S. (2006), 'A novel regulation on developmental gene expression of fruiting body formation in Myxobacteria', Appl. Microbiol. Biotechnol. **72**, 21–29.
- Vega-Palas, M. A., Flores, E. & Herrero, A. (1992), 'NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators', Mol. Microbiol. **6**, 1853–1859.
- Vega-Palas, M. A., Madueno, F., Herrero, A. & Flores, E. (1990), 'Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942', J. Bacteriol. **172**, 643–647.
- Wallace, D. M. (1987), 'Large- and small-scale phenol extractions', Methods Enzymol. **152**, 33–41.
- Weichart, D., Querfurth, N., Dreger, M. & Hengge-Aronis, R. (2003), 'Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*', J. Bacteriol. **185**, 115–125.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. (1999), 'Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins', Science **286**, 1888–1893.
- Wieser, M., Denner, E. B. M., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral, D., Lubitz, W., Maszenan, A. M., Patel, B. K. C., Seviour, R., Radax, C. & Busse, H.-J. (2002), 'Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974)', Int J Syst Evol Microbiol **52**, 629–637.
- Wilhelm, J. & Pingoud, A. (2003), 'Real-Time Polymerase Chain Reaction', ChemBiochem **4**, 1120–1128.
- Wright, R., Stephens, C., Zweiger, G., Shapiro, L. & Alley, M. R. (1996), '*Caulobacter* Lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation', Genes Dev. **10**, 1532–1542.
- Yang, C. & Kaplan, H. B. (1997), '*Myxococcus xanthus sasS* encodes a sensor histidine kinase required for early developmental gene expression', J. Bacteriol. **179**, 7759–7767.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985), 'Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors', Gene **33**, 103–119.

Veröffentlichungen und Beiträge

Eigene Veröffentlichungen

- Doß, S., Gröger, C., Knauber, T. and Treuner-Lange, A. (2005), Comparative genomic analysis of signal transduction proteins in clostridia, Handbook on Clostridia, edited by Peter Dürre
- Knauber, T., Doß, S., Gerth, K., Perlova, O. , Müller, R. and Treuner-Lange, A., Mutation in the *rel* gene of *Sorangium cellulosum* affects morphological and physiological differentiation. Zur Veröffentlichung eingereicht, in Revision

Teilnahme an Kongressen mit eigenem Beitrag (Vorträge und Posterpräsentationen)

- Doß, S. and Treuner-Lange, A. (2002), „Expression analysis of the *pph1*-gene in *Myxococcus xanthus*“, Tagungsband des 24.ten Symposiums „Mechanisms of Genregulation in Microorganisms“ auf Schloss Rauischholzhausen, Marburg, Posterpräsentation
- Doß, S. and Treuner-Lange, A. (2003), „Investigation of *pph1*-expression under different conditions and its dependence on the C-factor“, Biospektrum Sonderausgabe 2003 zur Jahrestagung der VAAM, Berlin, Posterpräsentation
- Knauber, T., Doß, S. and Treuner-Lange, A. (2004), „Physiological and morphological differentiation in the bacterium *Sorangium cellulosum*“, Tagungsband der BioPerspectives 2004 (DECHEMA), Wiesbaden, Posterpräsentation
- Doß, S. and Treuner-Lange (2004), „Analysis of morphological differentiation processes in *Sorangium cellulosum*“, Tagungsband der „31nd International Conference on the Biology of the Myxobacteria“, Lo-Skolen, Dänemark, Vortrag
- Doß, S. and Treuner-Lange, A. (2005), „Investigation of the morphological and physiological differentiation in *Sorangium cellulosum*“, Tagungsband des 25.ten Symposiums „Mechanisms of Genregulation in Microorganisms“, Blaubeuren, Vortrag
- Doß, S., Knauber, T. and Treuner-Lange (2005), „Lon-proteases in *Sorangium cellulosum*“, Tagungsband der „32nd International Conference on the Biology of the Myxobacteria“, Harrison Hot Springs, Kanada , Vortrag

- Doß, S., Knauber, T. and Treuner-Lange (2005), „Differentiation processes in *Sorangium cellulosum*“, Tagungsband der ASM Conference „Congress on Prokaryotic Development“, Vancouver, Kanada, Posterpräsentation
- Doß, S. and Treuner-Lange, A. (2006), „Lon-proteases in *Sorangium cellulosum*“, Tagungsband des „European Myxo-Meeting (EMM)“, Marburg, Vortrag
- Doß, S. and Treuner-Lange, A. (2006), „The function of Lon proteases in *Sorangium cellulosum*“, Biospektrum Sonderausgabe 2006 zur Jahrestagung der VAAM, Jena, Vortrag
- Doß, S. and Treuner-Lange, A. (2007), „Characterization of Lon protease mutants of *Sorangium cellulosum*“, Biospektrum Sonderausgabe 2007 zur Jahrestagung der VAAM, Osnabrück, Vortrag

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich auf meinem Weg zur Dissertation unterstützt haben und allen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

- Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriele Klug, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte und jederzeit für Fragen, Anregungen und konstruktive Kritik zur Verfügung stand.
- Meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud danke ich herzlich für die spontane Bereitschaft zur Übernahme der Zweitkorrektur, der Co-Betreuung im Graduiertenkolleg und für die lehrreichen Diskussionen im Rahmen des Graduiertenkollegs.
- Mein besonderer Dank gilt ferner meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau Dr. Anke Treuner-Lange, für die fachkompetente Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und für die wertvollen Anregungen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- Mein persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl Forchhammer für die fachkompetenten Diskussionen in Zusammenhang mit meiner Arbeit und die Bereitstellung des anti-GlnB *E. coli* IgG Konjugats.
- Mein ganz persönlicher Dank gilt außerdem meinen zwei herzallerliebsten „Chefkorrektoren“ Nicole und Tanja, die mir mit Rat und Tat beiseite standen und für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit. Ganz, ganz lieben Dank!
- Ein weiteres „Dankeschön“ geht an meine (ehemaligen) Laborkollegen Antje, Carolin und Tina. Antje möchte ich für die Versorgung mit allerlei Gummibärchen sowie für die Einführung in den sächsischen Sprachschatz (Plaste!) in der Anfangszeit meiner Promotion danken. Meiner Leidensgenossin Carolin möchte ich für die vielen kleinen hilfreichen Anregungen und Tips danken sowie für die vielen aufmunternden Worte über Skype während der langen Einsamkeit am Schreibtisch. Tina möchte ich vor allem dafür danken, dass sie immer wieder ein offenes Ohr für mich hatte, wenn So ce56 mal wieder nicht das tat, was es tun sollte. Des Weiteren möchte ich mich nicht nur für die oben erwähnte Hilfen und Aufmerksamkeiten, sondern auch für die netten und leckeren Abende in trauter „Viersamkeit“ bedanken.
- Danke an das Graduiertenkolleg „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“ für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums sowie für die Reisekostenzuschüsse. Ein „Dankeschön“ geht auch an Jamilah für das Management der tollen Aufenthalte auf Schloss Rauischholzhausen.

- Mein Dank gilt natürlich auch der AG Forchhammer, die mich immer wieder gerne in ihrem Labor „aufgenommen“ hat, wenn ich mal wieder Fragen hatte.
- Ein „Dankeschön“ auch an die AG Klug, die immer wieder wertvolle Tipps für mich bereithielt. Danke Sonja, für deine tolle Methode, RNA zu isolieren, die sogar bei So ce56 gut funktionierte. Danke auch an Pamela für den interessanten Austausch von Neuigkeiten (Skype sei gedankt) während des Zusammenschreibens.
- Meinen Eltern möchte ich für die unermüdliche Unterstützung während dieser Jahre danken. Sie haben mich in allen Umbrüchen und Veränderungen gestärkt und mir vieles möglich gemacht, das ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen wäre. Ebenfalls danken möchte ich meiner Oma Mariechen für die finanzielle Unterstützung vor allem in der letzten Phase meiner Promotion sowie meiner Oma Erna für die entspannenden Tage zwischendurch.
- Danke auch an meine „Schwiegerfamilie“ Helga, Uli, Caro, Kerstin und Opa Erich für die vielen offenen Ohren.
- Meiner Katze Valentine (Maus) gebührt ebenfalls Dank, da sie es mit vielen kleinen und nur allzu oft erfolgreichen Ablenkungsmanövern geschafft hat, mich vom Schreibtisch wegzulocken und so eine Pause erzwang, die später manchen Gipfel zu erklimmen half.
- Abschließen möchte ich mit einem ganz großen „Dankeschön“ an meinen Schatz Joachim. Ihm möchte ich vor allem für die Hilfe bei meinen Computerproblemen danken und dafür, dass er es überhaupt schon so lange mit mir ausgehalten hat. Er hat für meine Sorgen und Probleme immer ein offenes Ohr und hat mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich rechne es ihm hoch an, dass er sich durch diese Arbeit gekämpft und trotz des für ihn verwirrenden Dschungels an Fremdwörtern und exotischen Formulierungen noch zu konstruktiver Kritik fähig war.